Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F.R.C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Untersuchung der hypophysären Androgen-Biokonversion und der Gonadotropin-Serumspiegel bei männlichen Ratten während verschiedener sexueller Reifestadien und nach Behandlung mit LHRH sowie einem seiner Analogen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
KARL ECKHARD BAUR
aus Schwenningen

1985

Aus der Abteilung Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F.R.C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Untersuchung der hypophysären Androgen-Biokonversion und der Gonadotropin-Serumspiegel bei männlichen Ratten während verschiedener sexueller Reifestadien und nach Behandlung mit LHRH sowie einem seiner Analogen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
KARL ECKHARD BAUR
aus Schwenningen

1985

Dekan:	Professor Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Gupta
2. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Schmülling

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Im Gedenken an meinen Studienfreund
Markus Kupferschmid

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Hinführung zur Thematik und Literaturvergleich	1
1.2.	Problemstellung	9
2.	Methode	12
2.1.	Versuchsaufbau	12
2.2.	Materialien	13
2.3.	Tierversuch in vivo	16
2.3.1.	Tiere und Vorbehandlung	16
2.3.2.	Applikation des Wirkstoffes	21
2.3.3.	Serumgewinnung	22
2.3.4.	Hypophysenentnahme	22
2.4.	In vitro-Versuch (Biokonversions-Studie)	24
2.4.1.	Inkubation	24
2.4.2.	Extraktion und Trennung der markierten Substanzen	26
2.4.2.1.	Dünnschichtchromatographie (DC)	32
2.4.2.1.1.	Herstellung der DC-Platten	33
2.4.2.1.2.	Auftragen	34
2.4.2.1.3.	Entwickeln	35
2.4.2.1.4.	Acetylierung	36
2.4.3.	Messung der Radioaktivität	37
2.5.	Radioimmunoassay (RIA)	38
2.5.1.	Reagenzien	39
2.5.2.	Prozedur	40
2.6.	Validität der Methode	43
2.6.1.	Leerproben und Reinheitskontrolle	43
2.6.2.	Präzision	46
2.6.3.	Recovery	46

		Seite
2.7.	Auswertung	47
2.7.1.	Ergebnisberechnung	47
2.7.2.	Statistische Datenauswertung	47
3.	Ergebnisse	50
3.1.	Gonadotropine im Serum	51
3.1.1.	LH	51
3.1.2.	FSH	52
3.1.3.	Zusammenfassung	57
3.2.	Biokonversion von Testosteron und Androstendion	58
3.2.1.	Radiokohlenstoffmarkierte Substanzen	58
3.2.1.1.	Substratumbau: Testosteron	58
3.2.1.2.	Metaboliten	59
3.2.2.	Tritiummarkierte Substanzen	66
3.2.2.1.	Substratumbau: Androstendion	66
3.2.2.2.	Metaboliten	66
3.2.3.	Zusammenfassung	71
4.	Diskussion	74
4.1.	Gonadotropin-Serumspiegel	74
4.2.	Biokonversion	76
4.3.	Methodenkritik	81
4.4.	Schlußfolgerung	82
5.	Zusammenfassung	84
6.	Abkürzungen	86
7.	Tabellenanhang	87
8.	Literaturverzeichnis	94

1. EINLEITUNG

1.1. Hinführung zur Thematik

Die Entwicklung und Regulation von Sexualfunktionen geschieht in einem komplexen endokrinen System, das entsprechende Parallelen in andere Körperfunktionen regulierenden Systemen (z.B. Schilddrüse, Nebennierenrinde) hat.

Die Anwendung des Prinzips des Regelkreises, wie es im technischen Bereich schon lange bekannt ist, hat sich für die physiologische und pathophysiologische Betrachtungsweise von endokrinen Vorgängen dieser Art als besonders fruchtbar erwiesen.
Abb. 1 zeigt ein Schema eines solchen biologischen Steuerungs- und Regelsystems, in dem die Organe des Endokriniums - Hypothalamus, Hypophyse und periphere Drüse - die Regler und/oder das Stellglied darstellen, während die Information kaskadenartig durch die verschiedenen Hormone bis zur Einstellung der Regelgröße übertragen wird. Für den Bereich des Sexualendokriniums wurde der Begriff der hypothalamo-hypophyseo-gonadalen Achse geprägt. Die Regelgröße wird durch den Serumspiegel der männlichen und weiblichen Geschlechtshormone gebildet, die die sexuelle Reifung mit Ausbildung und Aufrechterhaltung der Geschlechtsmerkmale und der generativen Funktionen bewirken. Die Synthese und Sekretion dieser Sexualhormone wird beeinflußt von den Gonadotropinen aus der Hypophyse, dem Luteinisierenden Hormon (LH) und dem Follikelstimulierenden Hormon (FSH), die ihrerseits von einem Faktor aus dem Hypothalamus, dem oder den "gonadotropin releasing hormones" (GnRH) abhängig sind.

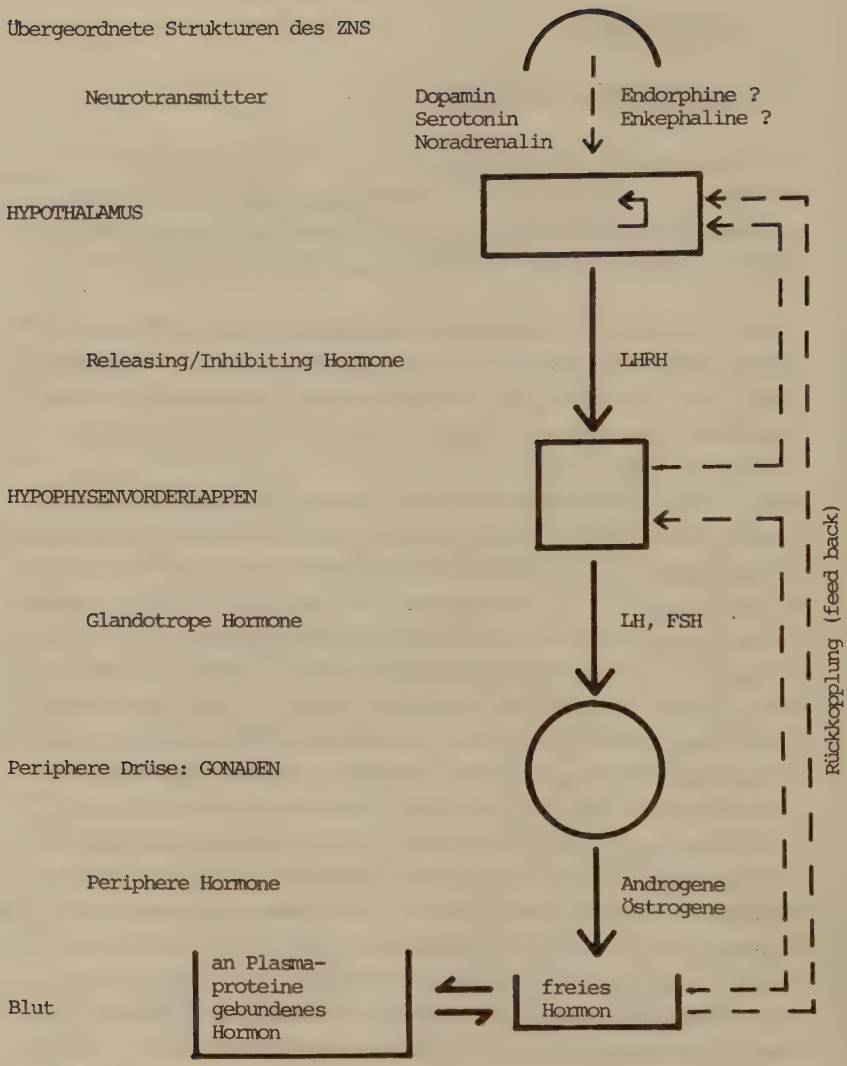


Abb. 1: Biologisches Regelsystem am Beispiel des Sexualendokriniums: Hypothalamus - Hypophysen - Gonadenachse (nach Scriba u. von Werder 1982)

Die Einstellung des Gleichgewichtes in diesem Hormonkomplex erfolgt über ein kompliziertes System verschiedener Rückkopplungsschleifen, die lange (z. B. Gonaden-Hypothalamus) bis ultrakurze Stufen (innerhalb des Hypothalamus) umfassen.
Neben dieser humoralen Regulation innerhalb der endokrinen Zentren scheint eine neurale Kontrolle des Hypothalamus durch übergeordnete Strukturen des ZNS zu bestehen (s. Abb. 1).

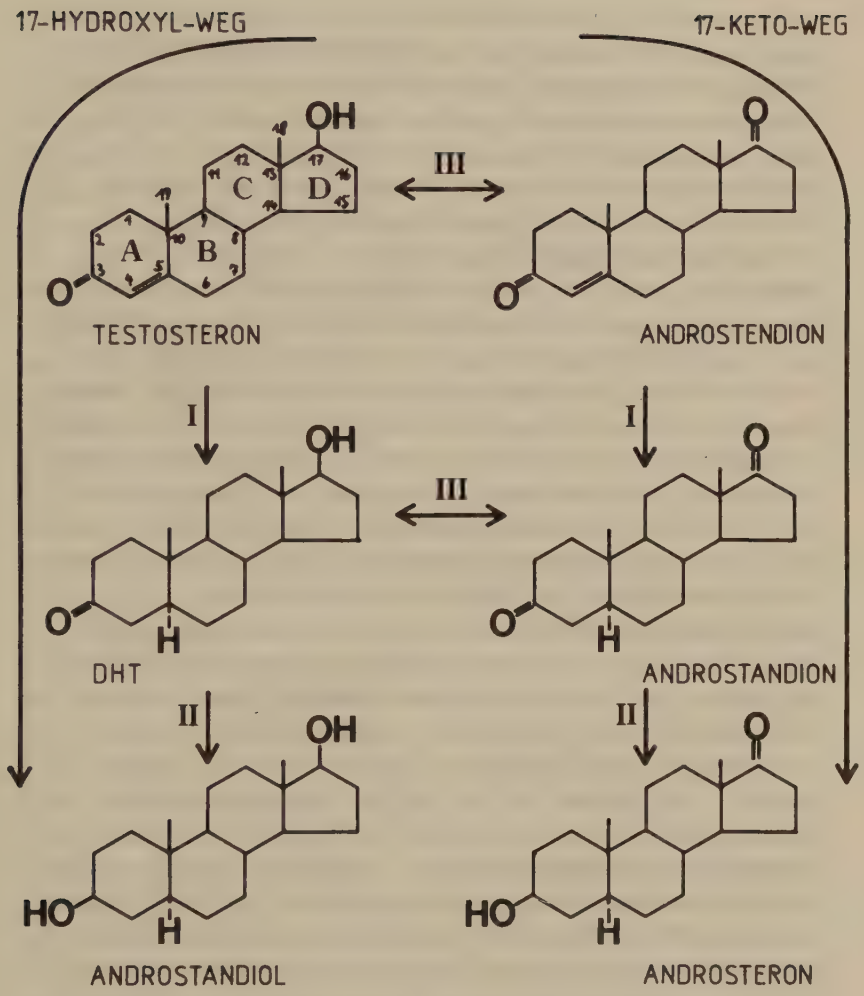
Wie es in diesem Regulationssystem zur Auslösung der Pubertät, der geschlechtlichen Reifung kommt, ist eine umstrittene Frage. Nach dem heutigen Erkenntnisstand werden im Falle des männlichen Geschlechts zwei Hypothesen diskutiert:

1. Pubertät als Resultat einer zunehmenden Empfindlichkeit der Hoden für die Gonadotropine (Odell 1973) oder
2. Pubertät als Resultat einer Veränderung der Empfindlichkeitsschwelle der hypothalamo-hypophysären Achse (sogenannter "Gonadostat") für die negativen Rückkopplungseffekte der Androgene (Hypothesis of differential sensitivity; Gupta 1977). Veränderungen dieser angenommenen Schwelle wurden auf verschiedenen Stufen des Regelkreises gefunden.

Ergebnisse mehrerer Untersucher sprechen dafür, daß die Rückkopplungsempfindlichkeit ("Fühler") zwischen den gonadalen Hormonen und den Gonadotropinen während der sexuellen Reifung eine Veränderung erfährt (Ramirez und Mc Cann 1965; Critchlow und Bar-Sela 1967; Smith und Davidson 1967; Negro Vilar, Krulich und Mc Cann 1973; Gupta 1974). Zahlreiche Berichte über Veränderungen des Plasma-Testosteron-Spiegels (Resko et al. 1968; Miyachi et al. 1973) und der Serum-Gn (Ramirez und Mc Cann 1965; Yamamoto et al. 1970; Amatayakul et al. 1971; Swerdloff et al. 1971; Root und Russ 1972; Negro Vilar et al. 1973) während des Rei-

fungsprozesses liegen vor.
Gupta et al. (1975) zeigten bei intakten, kastrierten und cryptorchiden Ratten deutlich die Schwankungen, die die Serumspiegel von T, DHT, LH und FSH über die Zeit vor, während und nach der Pubertät erfahren. Wie Debeljuk et al. (1972) fand diese Gruppe ebenfalls eine vom Reifestadium abhängige Freisetzung von Gonadotropinen aus der Hypophyse nach Gabe von synthetischem LHRH (Gupta und Eichner 1977; Gupta et al. 1975 a,b).
Weitere Untersuchungen ergaben, daß nach Orchidektomie mit Ansteigen des endogenen LHRH die Biotransformation von T in der Hypophyse, wiederum altersabhängig, verändert wird (Klemm und Gupta 1975; Gupta et al. 1978). Dabei wurde eine klare Korrelation zwischen den in vitro durch die Hypophyse gebildeten 5-alpha-Metaboliten Androstandiol bzw. DHT und dem Serumspiegel von LH bzw. FSH gefunden (Klemm et al. 1976).

Die Aktivität der Enzyme, die die Androgene in ihren Zielorganen Gonaden, Hypophyse, Hypothalamus zu mehr oder weniger aktiven Metaboliten umformen (Abb. 2 zeigt mögliche Stoffwechselwege) ist somit ein weiterer Faktor, der mit der beobachteten Veränderung der Empfindlichkeitsschwelle während des Pubertätsbeginns in Zusammenhang gebracht werden kann.
Einige wichtige Etappen in der Erforschung des Androgenmetabolismus seien im folgenden überblicksartig genannt: Bruchovsky und Wilson lieferten Anhaltspunkte dafür, daß Wirkungen von Testosteron in der Zelle teilweise seiner Konversion zu DHT zuzuschreiben sind (1968). Ein solcher Metabolismus wurde auch in cerebralen Zielorganen bei Ratten und beim menschlichen Feten nachgewiesen (Jaffe 1969). Die Präsenz von "steroid converting enzymes" in Zielorganen des ZNS wurde zunächst "in vitro" und dann auch in vivo gezeigt (Sholiton et al. 1972).



I = 5-alpha-Reduktase

II = 3-alpha-Hydroxysteroid-Dehydrogenase

III= 17-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Abb. 2: Abbauweg der Androgene über die Ring-A-Reduktion (nach Shanies et al. 1972).

Ein starker 5-alpha-Metabolismus in Hypophyse und Hypothalamus sowie eine quantitative Veränderung dieses Stoffwechselgeschehens nach Kastration, Testosteron-Behandlung oder Beigabe von Gonadotropinen in vitro wurde von der Arbeitsgruppe um Martini gezeigt (Massa et al. 1972). Weiterhin fand sich eine im Vergleich zum Testosteron stärkere Potenz der 5-alpha-reduzierten Produkte, den LH-Spiegel zu unterdrücken (Zanisi et al. 1973). Diese Rückkopplungswirkung der Androgene wurde auf zellulärer Ebene, und zwar auf die gonadotrophen Zellen in der Hypophyse in vivo nachgewiesen. Es wurde vermutet, daß die 5-alpha-Reduktion an der Hemmung der Gonadotropine beteiligt sei. (Kingsley und Bogdanove 1973). Andere Arbeitsgruppen führten diesen Effekt auf die Beteiligung eines anderen Stoffwechselweges zurück, der von Testosteron via 19-OH-T zur Aromatisierung und so zum Oestradiol führt, das ein in viel geringeren Dosen wirksamer Inhibitor der Hypophysenhormone ist (Naftolin et al. 1972).
Nachdem gezeigt worden war, daß in der Hypophyse erwachsener Ratten die DHT-Bildung durch Entfernung der Gonaden und Behandlung mit Sexualhormonen modifizierbar ist und daß diese Modifikation mit den Veränderungen der unter gleicher Behandlung gemessenen Gonadotropin-Sekretion parallel geht (Denef et al. 1973), wurden solche Veränderungen auch bei unreifen Tieren festgestellt und eine erhöhte DHT-Bildung unmittelbar postnatal sowie bei Eintritt in die Pubertät gemessen (Denef et al. 1974; Klemm und Gupta 1975; Klemm et al. 1976; Gupta et al. 1978). Von anderer Seite wurden Hinweise für eine zusätzliche Veränderung der hypophysären 17-beta- wie auch 3-alpha-Dehydrogenase-Aktivität nach Kastration von erwachsenen Tieren erbracht (Péréz et al. 1975; Nguyen et al. 1974); subzelluläre Lokalisation und Eigenschaften dieser Enzyme wurden bestimmt (Inano et al. 1974; Nguyen et al. 1974). Daß die 5-alpha-Reduktase-Aktivität im Hoden von unreifen

Ratten von den Gonadentropinen abhängig ist, ließ sich an hypophysektomierten Tieren zeigen (Nayfeh et al. 1975). Die Ergebnisse einer Koinkubation von Hypophysen mit Hypothalamusgewebe intakter und kastrierter männlicher Ratten sowie mit synthetischem LHRH ließen auf eine Beziehung zwischen diesem Releasing Hormone und der 5-alpha-Reduktase-Aktivität schließen (Has et al. 1975).
Mit der Verfügbarkeit von verschiedenen endokrin aktiven Stoffen aus dem Hypothalamus, sogenannten Releasing Hormonen, waren wertvolle Hilfsmittel zur Hand; einerseits zur weiteren Erforschung der Stoffwechselzusammenhänge, andererseits zur Diagnostik und Therapie hormonell bedingter Störungen und Krankheiten. Die Isolierung, Bestimmung der Aminosäuresequenz und Synthetisierung des LH-Releasing Hormones (s. Abb. 3) wurde 1971 durch Schally et al. erreicht. Die deutliche Wirkung dieses Peptidhormons auf die FSH-Freisetzung aus der Hypophyse sprach für eine Identität des LH- und FSH-Releasing Hormones (Schally et al. 1971; Schally et al. 1971a). Zahllose Arbeiten beschäftigten sich daraufhin mit den pharmakologischen Eigenschaften des Releasing Hormones bei Mensch und Tier (z. B. Schally et al. 1971 a; Miyachi et al. 1973; Kastin et al. 1972; Kelch et al. 1975; Yen et al. 1972; Swift und Crighton 1978). Einen Überblick gibt Nair et al. (1978).
Viele Laboratorien befaßten sich mit der Entwicklung analoger Stoffe, um einerseits bessere Aufschlüsse über den molekularen Wirkungscharakter zu erhalten, andererseits zur Verbesserung von pharmakologischen Eigenschaften wie Wirkungspotenz und Wirkungsdauer oder aber antagonistischer Wirkung beizutragen (Vale et al. 1976; Nair et al. 1978). So führt z. B. eine Veränderung am C-terminalen Ende des Moleküls mit Ersatz des Glycins durch Äthylamid (Des-Gly^{10} -LHRH-ethylamide) oder andere Alkylamine zu einer Steigerung der Releasing-Aktivität im Vergleich zum Mutterhormon (Fujino et al. 1972). Eine weitere Aktivitätserhöhung und Wirkungsverlängerung läßt sich erreichen, indem

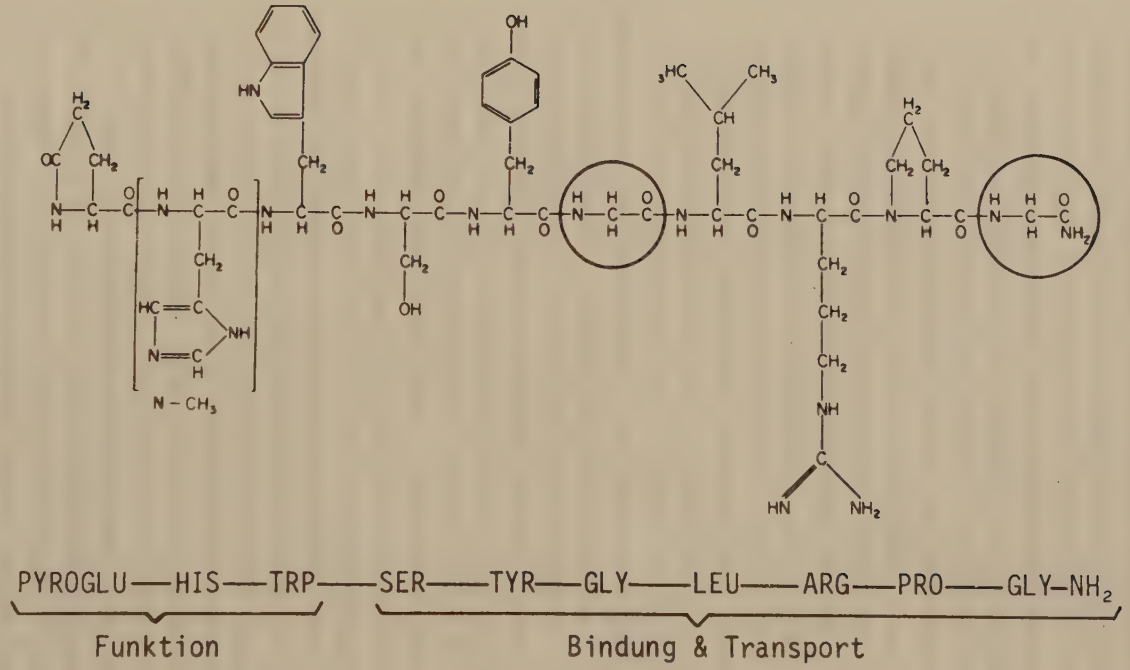


Abb. 3: Strukturformel von LHRH
Ersatz des Gly^6 durch D-Aminosäuren und/oder des Gly^{10} durch Amide führt zu superaktiven analogen Hormonen.

das Glycin in Position 6 durch D-Aminosäuren wie z. B. D-Alanin, D-Leucin oder D-Serin ersetzt wird (Coy et al. 1974; Nair et al. 1978; Vale et al. 1976; Reeves et al. 1977). Untersuchungen über die Aufnahme von radioaktiv markiertem LHRH und einigen seiner Analogen in die Hypophyse und andere Gewebe ließen vermuten, daß eine Ursache für die größere biologische Potenz der Analogen in der verstärkten und längeren Bindung an die Rezeptoren liegt (Reeves et al. 1977). Eine weitere Ursache könnte in einer verlangsamten Abbaurate durch spezifische Peptidasen zu sehen sein, wie von Swift und Crighton (1978) und von Griffiths und Hopkinson (1979) gezeigt wurde.

1.2. Problemstellung

Sexualfunktionen und geschlechtliche Reifung werden durch das hypothalamo-phypophysäre System kontrolliert. Eine komplizierte Vielfalt verschiedener Mechanismen erlaubt eine fein abgestimmte Regulation. Faktoren, die diese Regulation beeinflussen, sind z. B. (s. Abb. 1)

- Beeinflussung des Hypothalamus durch Stimuli aus übergeordneten Strukturen des ZNS (Neurotransmitter und andere, noch wenig erforschte Stoffe)
- Beeinflussung der Hypophyse durch den Hypothalamus, d.h. Regelung der Freisetzung, der Synthese und des Kohlehydratanteils der Gonadotropine LH und FSH
- Rückkopplung a) innerhalb des Hypothalamus
  b) von Hypophyse zum Hypothalamus
- Rückkopplung von den Gonaden über die Sexualhormone
  a) zur Hypophyse
  b) zum Hypothalamus
  c) zu anderen zentralnervösen Strukturen (?)
- Modifikation dieser Rückkopplung durch
  a) Rezeptorengehalt
     Rezeptorenaffinität
  b) Konversion der Sexualhormone zu aktiveren Metaboliten durch die entsprechenden Enzymsysteme

Aus der Sicht der "hypothesis of differential sensitivity" könnten zumindest einige dieser Faktoren zu einer Veränderung der Empfindlichkeitsschwelle der Regelsysteme während der geschlechtlichen Reifung führen. Der hypophysären Biokonversion der Androgene soll hier besondere Beachtung geschenkt werden.

Es ist bekannt, daß nach Kastration die Gonadotropinserumspiegel von männlichen Ratten drastisch ansteigen. Gupta et al. (1978) und andere Untersucher konnten zeigen, daß nach Wegfall der Rückkopplungssignale aus den Gonaden die Aktivität von Steroidenzymen, besonders der 5-alpha-Reduktase, in der Hypophyse ansteigt. Die Erhöhung der Serumgonadotropine ist Folge einer verstärkten Stimulation durch LHRH. Eine vermehrte Aktivität der Steroidenzyme könnte ebenfalls auf einen LHRH-Einfluß zurückgeführt werden. Indirekt wird diese Vermutung durch Korrelationen zwischen der Menge 5-alpha-reduzierter Metaboliten des Testosteron und den Gonadotropin-Serumspiegeln bestärkt (Klemm et al. 1976; Gupta et al. 1978). Weiter bestärken dies die Ergebnisse von Has et al. (1975), die über einen Enzymaktivitätsanstieg nach Zugabe von LHRH zu Hypophyseninkubat berichten.

Die Gonadotropin-Serumspiegel weisen altersabhängige Schwankungen auf, die sich bestimmten Stadien der sexuellen Reifung zuordnen lassen. Die Frage, ob solche Schwankungen auch bei den Enzymaktivitäten in der Hypophyse zu finden sind, wird widersprüchlich beantwortet (Denef et al. 1974; Massa et al. 1975; Klemm et al. 1976; Gupta et al. 1978). Aktivitätsveränderungen der Enzyme, die das hypothalamo-hypophysäre System mit potenten, intrazellulär wirksamen Androgenen versorgen, könnten die Empfindlichkeitsschwelle des Reglers während der sexuellen Reifung beeinflussen.

Die vorliegende Studie soll Anhaltspunkte zur Beantwortung folgender Fragen liefern:

1) Unterliegt die Biokonversion von
   a) Testosteron
   b) Androstendion
   einer Modifizierung in der Rattenhypophyse während der verschiedenen sexuellen Reifestadien?
2) Hat exogen verabreichtes LHRH in einer Zeitspanne, in der es die Ausschüttung der Gonadotropine maximal stimuliert, einen Einfluß auf diese Biokonversion? Wird im positiven Fall ein solcher Einfluß ebenfalls altersabhängig modifiziert?
3) Drückt sich die stärkere biologische Aktivität eines LHRH-Analogen (D-Ala^{6}-DesGly^{10} -LHRH-EA) in einem verstärkten Effekt auf diese Biokonversion aus?

2. METHODE

2.1. Versuchsaufbau

- Tierversuch in vivo:
  Männliche Wistar-Ratten
  Altersstufen: 20, 35, 50 und 90 Tage
  Behandlungsarten:
  N Physiologische NaCl-Lösung (Kontrollgruppe)
  L LHRH 0,4 µg/100 g Körpergewicht
  S Superaktives analoges Hormon 0,04 µg/100 g KG
  SS Superaktives analoges Hormon 0,4 µg/100 g KG
  = D-Ala^{6}-DesGly^{10}-LHRH-ethylamide
  Applikation: Intraperitoneale Injektion
  Wirkungszeit: 30 min

- In vitro-Versuch (Biokonversions-Studie)
  Inkubation von Hypophysengewebe
  Substrate: ^{14}C-Testasteron
  ^{3}H-Androstendion
  Trennung und Identifizierung der Androgene Testosteron, Androstendion, DHT, Androstandiol, Androstandion, Androsteron: Dünnschichtchromatographie
  Dünnschichtscanner
  Radiometrie: Flüssigkeits-Scintillationszählung

- Bestimmung der Serum-Gonadotropine LH und FSH:
  Radioimmunoassay

- Statistik:
  Zweifaktorielle Varianzanalyse

2.2. Materialien

Chemikalien von

Fa. Merck, Darmstadt:

Androsteron	Nr. 24 604
DHT	Nr. 3685
Testosteron	Nr. 2415
Aceton	Nr. 14
Essigsäureäthylester (Äthylacetat)	Nr. 9623
Äthanol	Nr. 972
Benzol	Nr. 1783
Chloroform	Nr. 2445
Propanol-(2)	Nr. 9634
Molybdatophosphorsäure	Nr. 532
HCl, 0,1-N	Nr. 9060
Natriumhydrogencarbonat	Nr. 6329
Kieselgel Typ 60 G	Nr. 7731
Kieselgel mit Feuchtigkeits-indikator (Blaugel)	Nr. 1925
Essigsäureanhydrid	Nr. 42
Pyridin	Nr. 9728

Fa. Serva-Feinbiochemika, Heidelberg:

Androstandion	Nr. 135 40
Androstendion	Nr. 136 00

Fa. Sigma, St. Louis, USA:

Androstandiol	Nr. A-7755

Fa. Boehringer, Mannheim:

Glucose-6-phosphat (Di-Natriumsalz)	Nr. 15 307
NADP (oxidiert als Di-Natriumsalz)	Nr. 128031

Fa. Hoechst, Frankfurt am Main:

Relefact^{R} LH-RH 0,025 mg/1 ml

Fa. Beckman, Genf, Schweiz:

D-Ala^{6}-DesGly^{10}-LH-RH-ethylamide

Fa. Zinsser:

Quickszint 501 Nr. 16 808

Universitätsapotheke Tübingen:

Hank'sche Lösung, sterilfiltriert

Fa. NEN New England Nuclear, Boston, Mass., USA:

Androst-4-en-3,17-dion	/1,2-^{3}H(N)/	NET-181
Testosteron	/4-^{14}-C/	NEC-101

Geräte:

a) Tierversuch

Tierwaage (Haushaltswaage bis 1000 g)
Tuberkulinspritzen
Injektionsnadeln wie zur s.c.-Injektion
Schere, groß
Präparationsbesteck
Korkplatte, Nadeln zum Feststecken
Trichter
Reagenz- und Serumröhrchen
Eiswasser

b) In vitro-Versuch

pH-Meter E 300 (Metrohm, Herisau, Schweiz)
Analysenwaage bis 160,000 g (Sartorius)
Analysenwaage bis 20,000 000 g (Sartorius)
Wasserbad mit
  Thermostatheizung und Mischer
  Schüttelaufsatz
  Begasungsvorrichtung
Carbogen in der Druckflasche (95 % O_2/5 % CO_2)
Schüttelgerät
Rota-Mixer
Shandon-Schiene (Shandon, London, GB)
Halter für DC-Platten
Trennkammer für die DC 60 x 60 x 20 cm
Trennkammer für die DC 20 x 20 x 10 cm
Heizschrank mit Thermostat und Zeitschaltuhr
Dünnschicht-Scanner für Radiochromatogramme LB 2723 mit
  Dual-Ratemeter Integrator LB 242 K
  Zweikanal-Schreiber Modell 232 (sämtlich Fa. Berthold, Wildbad)
Sprühgerät "Spray Gun"
Fritten
Spitzgläser mit Schliff, Glasstopfen
Eppendorf-Pipetten 5 - 1000 µl
Auslaufpipetten
versch. Meßkolben und -zylinder
Magnetrührer
Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 2002
Scintillationsröhrchen

2.3. Tierversuch in vivo

2.3.1. Tiere und Vorbehandlung

Die in dieser Studie verwendeten Tiere waren männliche Wistar-Ratten des Ivanovas-Stammes (Fa. S. Ivanovas GmbH & Co, Med. Versuchtstierzuchten KG, Kissleg/Allgäu). Dieser Stamm tritt im Alter von etwa 30 Tagen in die ersten Pubertätsstadien ein. Spermatogenese ist in einem Alter von etwa 58 Tagen nachzuweisen (Gupta et al. 1978). Die ausgewählten Altersstufen lassen sich demnach wie folgt einordnen:
20 Tage: juvenil
35 Tage: frühpubertär
50 Tage: spätpubertär
90 Tage: erwachsen.

Die Tiere konnten sich drei Tage im Tierstall der Klinik akklimatisieren, hatten freien Zugang zu Wasser und einer Standardnahrung und waren künstlicher Raumbeleuchtung von 6 bis 19 Uhr ausgesetzt. (Ein Einfluß von verschieden langen Hell-Dunkel-Perioden auf hier interessierende Enzymaktivitäten scheint sich nur im Hypothalamus und in der Prostata, nicht aber in der Hypophyse bemerkbar zu machen /Shapiro et al. 1976/).
Um Schwankungen, die im zirkadianen Rhythmus auftreten können, zu vermeiden, wurden die Experimente stets zur selben Tageszeit, frühmorgens von 6 Uhr bis 8.30 Uhr, ausgeführt. (Zur Versuchstierhaltung s. Jung 1958)

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere auf einer Haushaltswaage mit einer Genauigkeit von 1 g gewogen und markiert (Tab. 1).
Im weiteren wurde durch das Anlegen von Checklisten, auf denen die einzelnen methodischen Schritte protokolliert wurden, eine Standardisierung und Kontrolle des Versuchsablaufs erreicht (Abb. 4a - 4c).

Tab. 1: Gewicht der Versuchstiere

Alter der Tiere (Tage)	20	35	50	90
Anzahl n der Tiere	140	69	55	25
Mittleres Körpergewicht in g	26,0	75,3	149,3	257,0
Standardabweichung s in g	2,83	6,7	7,9	7,5
Variation v vom mittleren KG in %	10,9	8,9	5,3	2,9

Tab. 2: Gewicht der Hypophysen

Alter der Tiere (Tage)	20	35	50	90
Mittleres Einzelgewicht der Hypophysen in mg	1,53	3,13	5,23	7,85
Mittlere Anzahl der Organe eines Probenansatzes	5,8	2,9	2,3	1,0
Mittleres Gewicht eines Probenansatzes in mg	8,91	9,00	11,99	7,85
Standardabweichung s in mg	1,32	1,20	1,21	0,98
Variation v in %	14,8	13,3	10,1	12,5

Abb. 4 a

Checkliste und Protokoll für Tierversuch und Inkubation

Probe Nr. ..... Datum .....

Rattenalter .... Tage

Behandlung: NaCl ... LHRH ... S 0,04 ... SS 0,4 ...

Ratte	I	II	III	IV	V	VI
Gewicht						
Injektionsvolumen						
Injektionszeit						
Dekapitationszeit						

Hypophysen

Gewicht: Inkubationsgefäß + Gewebe .....,.. mg
leeres Inkubationsgefäß .....,.. mg
Gewebemenge .....,.. mg
heißer Puffer (300 µl/10 mg) .....,.. µl

Inkubation von ..... bis .....

Hypophysen zerkleinert ...
... ml (Äthylacetat) u. kalte Steroide;
10 min schütteln bei 175 U/min ...;
Zentrifugieren und Überstand abpipettieren ...;
... ml (s.o.) Äthylacetat und kalte Metaboliten;
10 min schütteln bei 175 U/min ...;
Zentrifugieren und Überstand abpipettieren ...;
Überstände vereinigt und verdampft ...;

Aufgetragen auf Platte Nr. ..... Bahn .....

Blut

gesammelt um .....Uhr; zentrifugiert um ..... Uhr
200 µl jeweils abpipettiert für: LH ... FSH ...
RIA-Röhrchen eingefroren am .....

Bemerkungen:

Abb. 4 b
Checkliste und Protokoll für DC und Radiometrie

Puffer-Ansatz, heiß vom .....
..... ml Puffer + ...µl ^{3}H + ...µl ^{14}C
2 x 50 µl auszählen ... (Aktivität s. u.)
Platte (20 x 40) Nr. ..... aufgetragen am .....

Bahn 1 Referenzengemisch ...
2 Probe Nr. .....
3 .....
4 .....
5 .....
6 Referenzengemisch ...

akklimatisiert ... min (Kammersättigung?!)

Trennung von ..... bis ..... Uhr

Laufmittel-Front markiert ...;
Platten angefärbt ...;
Rf-Werte: 1: .... 2: .... 3/4: .... 5: .... 6: ....;
Scannerdiagramm ...;
Zonen eingeteilt ...;
Felder abgekratzt ...
Eluiert mit 3 x 2,5 ml Äthylacetat: 1x ... 2x ... 3x...;
Eluate eingedampft ...

in 1 ml Äthanol gelöst ...
davon 100 µl in Szint.-gefäß ...; ausgezählt am .....;

Recovery:
Aktivität v. 50 µl Puffer (Ø): Kanal 1 ..... counts/10 min
Kanal 2 ..... counts/10 min

Probe Nr.

zugeg. Puff. (µl)

Aktivität vor K1
Inkubation (c/10) K2

wiedergefundene K1
Aktivität (c/10) K2

K1
Recovery % K2

Abb. 4 c

Checkliste und Protokoll für Acetylierung

Datum .....

restl. Eluat von Feld 3/4 eingedampft ...;
Referenzengemisch mit angesetzt ...;
Zusatz von 100 µl Essigsäureanhydrid ...;
100 µl Pyridin ...;
Ansatz geschüttelt ... und 1 Tag stehengelassen ...;
Ansatz eingedampft ...;

Platte (20 x 30) Nr. ..... aufgetragen am .....;

Bahn 1 Referenzengemisch ...
2 Probe Nr. .....
3 .....
4 .....
5 .....
6 Referenzengemisch ...
akklimatisiert ... min (beide Kammern gesättigt?!);
Trennung (Benzol/Essigsäureäthylester) von ..... bis
..... Uhr;
LM-Front markiert ...;
Platte angefärbt ...;
Rf-Werte: 1: .... 2: .... 3: .... 4: .... 5: .... 6: ....;
Scannerdiagramm ...;
Zonen eingeteilt ...;

Felder abgekratzt ....;
Eluiert mit 3 x 2,5 ml Ähtylacetat: 1x ... 2x ... 3x ...
Eluate eingedampft ...;
in 1 ml Äthanol gelöst ...;
davon 100 µl in Szint.-gefäß ... ausgezählt .....;

Recovery:
Probe Nr.

Aktivität der	K1
Zone 3/4 (c/10)	K2
wiedergefundene	K1
Aktivität (c/10)	K2
Recovery %	K1
	K2

2.3.2. Applikation des Wirkstoffes

Die Konzentrationen der Pharmaka wurden so gewählt, daß die erforderliche Dosis von 0,4 bzw. 0,04 µg/100 g KG in einem Volumen von etwa 100 µl verabreicht werden konnte.

Eine intravenöse Applikation von Drogen kann bei Ratten über die Schwanzvene erfolgen. Da jedoch vornehmlich bei infantilen Tieren die Venenpunktion wegen des zarten Kalibers des Gefäßes unsicher und bei längerem "Suchen" nach der Vene oft mit erheblichen Streßreaktionen verbunden ist, wurde hier der intraperitoneale Weg vorgezogen. Diese Applikationsart wurde z. B. auch von Miyachi et al. (1973) angewandt. Ein Vergleich zwischen subcutaner und intravenöser Injektion von LHRH ergab keine wesentlichen zeitlichen Differenzen in der Gonadotropinantwort (Arimura et al. 1973). Innerhalb von 30 min nach i.v.-Gabe werden bei allen Altersstufen maximale Gn-Serumspiegel erreicht (Gupta und Eichner 1977). Diese Zeitverhältnisse können auch für die i.p.-Gabe angenommen werden.
Bei der i.p.-Applikation besteht die Gefahr, Bauchorgane, v.a. Darm, zu punktieren oder aber ein extraperitoneales intramuskuläres Depot zu setzen. Um eine sichere i.p.-Injektion zu gewährleisten, wurde folgende Technik angewandt: Ein Helfer faßt das Tier im Nacken, indem er das Fell direkt hinter dem Schädel so rafft, daß das Tier seinen Kopf nur wenig bewegen kann, mit der anderen Hand fixiert er die Hinterbeine. Der Injizierende hebt die Bauchwand des Tieres im oberen Bereich des linken unteren Quadranten mit zwei Fingern ab und spritzt das dem Körpergewicht entsprechende Volumen unter die so entstandene Falte. Die sichere Plazierung der Injektion wurde in Vorversuchen mittels Farbstoffeinspritzung kontrolliert.

Die Tiere für einen Probenansatz (je nach Alter 1 bis 6 Tiere) wurden im Abstand von 2 min behandelt - eine Zeit, die für die spätere Entnahme der Organe ausreichte. Nach erfolgter Injektion wurden die Tiere für 30 min in ihren Käfig zurückgebracht.
Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Tiere durch Dekapitation getötet, das Stammblut wurde aufgefangen, die Hypophyse innerhalb 1 min entnommen und in eisgekühltes Puffermedium gebracht.

2.3.3. Serumgewinnung

Das Stammblut der Tiere eines Probenansatzes wurde mittels eines Trichters in einem Plastik-Serumröhrchen gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C mindestens 2-3 Std. stehen gelassen. Vor der Zentrifugation wurde der Blutkuchen mit einem Glasstab vorsichtig von der Wandung des Serumröhrchens gelöst. Nach dem Abzentrifugieren bei 3 000 upm über 10 min wurden 200 µl Serum jeweils für die FSH- und LH-Bestimmung in verschließbare Röhrchen pipettiert und bei -20°C bis zur Auswertung eingefroren.

2.3.4. Hypophysenentnahme*)

Die Hypophyse kann auf folgende Weise rasch und sauber entnommen werden: Das Fell wird von der Wundseite her in Schädelmitte aufgeschnitten, nach beiden Seiten von der Kalotte abgelöst und auf einer Korkplatte mit Nadeln festgesteckt. Das Schädeldach wird vom Hinterhauptsloch aus beidseitig in Höhe der temporo-parietalen Nähte gespalten

*) zur Anatomie bei der Ratte s. Greene 1968, Zeman and Innes 1963

und nach vorne geklappt. Mit den Branchen einer gebogenen Pinzette unterfährt man vorsichtig das Frontalhirn und klappt das Gehirn als Ganzes nach hinten. Dabei zerreißt das Infundibulum, das die Lage der Hypophyse markiert. Die Hypophyse liegt in der bei der Ratte sehr flachen Sella in einer Duratasche, die man mit der Pinzette vorsichtig eröffnet. Mit einem feinen Spatel oder einer Drahtöse wird das Organ entnommen und in ein Röhrchen mit eisgekühltem Puffermedium gegeben.
Um eine Gewebemenge von etwa 10 mg zu erhalten, mußten bei den jüngeren Tieren mehrere Organe zu einer Probe vereinigt werden.
Die Hoden der Tiere wurden für eine Parallelstudie entnommen (A. Braun).

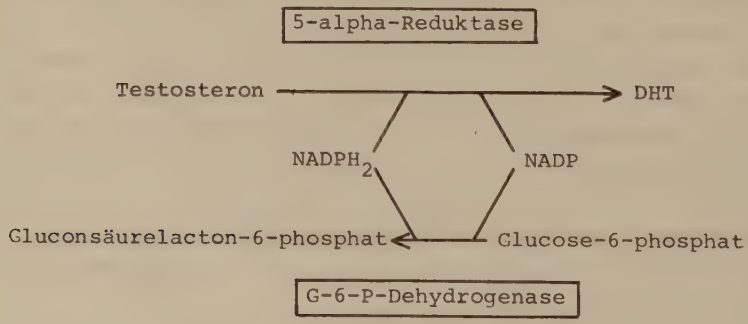
Auf einer Analysenwaage (Sartorius; bis 20,000000 g) wurde das Gewicht der Proben mit einer Genauigkeit von 0,01 mg bestimmt (Tab. 2).
Beim Wiegen von Flüssigkeiten macht sich - bei geringen Mengen - die Verdunstung bemerkbar: die Waage kann sich nicht einpendeln und verändert die Anzeige im Zehntelmilligrammbereich rasch. Die Hypophysen wurden deshalb mit einer selbstgefertigten Drahtschlinge aus der Pufferflüssigkeit entnommen, mit einem Papiertüchlein vorsichtig abgetupft und in ein zuvor abgewogenes, trockenes Inkubationsglas mit Schliff überführt und so auf die Waage gebracht.

2.4. In vitro-Versuch (Biokonversions-Studie)

2.4.1. Inkubation

Den gewogenen intakten Hypophysen wurde Inkubationsmedium in einer Menge von 300 µl/mg Gewebe zugesetzt. In einem Dubnoff-Shaker wurde der Ansatz im Wasserbad bei 37°C unter Carbogen-Begasung (O_2 : CO_2 = 95:5 Vol %) 1 Stunde lang inkubiert. Hierbei wurden Spitzgläser mit Schliff verwendet.

In der Literatur ist sowohl die Verwendung von Hypophysen in toto (Denef et al. 1973, 1974; Has et al. 1975; Klemm et al. 1975, 1976; Gupta et al. 1978) wie auch von zer stückeltem Gewebe (Massa et al. 1982; Sholl et al. 1975) zu finden. Denef et al. (1973) berichten von einer deutlich höheren Ausbeute bei Inkubation intakter Organe im Vergleich zu zerkleinertem oder homogenisiertem Gewebe.
Die Zusammensetzung des Inkubationsmediums wurde so gewählt, wie sie von Steinberger und Ficher (1971) für Biokonversionsstudien an Hodengewebe beschrieben wird. Bei Klemm et al. (1975, 1976) und Gupta et al. (1978) hatte sich dieses Medium für Hypophysengewebe bewährt. Quelle für die Versorgung der zumeist reduktiv verlaufenden Stoffwechselprozesse bildet das $NADPH_2$, das im Pentosephosphatzyklus aus NADP regeneriert wird:



Inkubationsmedium:

1 ml Hank'sche Lösung
175 µl NADP (3,257 nmol/l)
175 µl G-6-P (36,17 nmol/l)
125 µl 1,3 %ige $NaHCO_3$-Lösung
mit 0,1 n-HCl auf pH 7,4 eingestellt (für 7,5 ml Lösung ca. 100 µl HCl)

Zu diesem Medium wurden folgende Substrate gegeben:

- Testosteron-4-^{14}C (S.A. 57,75 mCi/mmol)
  in einer Konzentration von 350 µg/l, entsprechend einer Molarität von 1,2 µmol/l.
- Androstendion-1,2-^{3}H (S.A. 60,0 Ci/mmol)
  zusammen mit unmarkiertem Androstendion. Die Gesamt-Androstendion-Konzentration betrug ebenfalls 350 µg/l (= 1,2 µmol/l).

Das Tritium-markierte Androstendion besitzt eine hohe spezifische Aktivität. Um den Verbrauch radioaktiver Substanzen gering zu halten, wurde "kaltes" Androstendion zugesetzt. Das Verhältnis von markiertem zu unmarkiertem Hormon betrug 16:334.

Zur Substratkonzentration sei angemerkt:
Testosteron: Zwei Autoren beschreiben das Phänomen, daß keine Substratsättigung unterhalb der Löslichkeitsgrenze von T in Wasser zu erreichen sei (Rommerts und van der Molen 1971; Denef et al. 1973). Denef et al. geben 2 K_M-Werte für die Hypophysengewebe an: 2 µmol/l und 15 µmol/l. Da die Plasmaspiegel von T bei normalen Ratten in der Größenordnung von 10^{-2} µmol/l (Resko et al. 1968) liegen und die Hypophyse das Hormon in vitro nicht stärker als 10-fach konzentriert (Samperez et al. 1971), maßen sie dem niedrigeren K_M-Wert die größere Bedeutung bei und legten sich auf eine Molarität von 1,2 µmol/l fest. Diese

Substratmolarität wurde für die vorliegende Studie übernommen. Die Interferenz mit endogenem Steroid und mit dem System mit höherem K_M-Wert ist dabei zu vernachlässigen (Denef et al. 1973).
Die bei Denef et al. (1973) genannte Enzymcharakteristik wird in der Größenordnung von anderen Autoren bestätigt. Nguyen et al. (1974) bestimmten den K_M-Wert mit 1,8 µM bei intakten bzw. 2,8 µM bei kastrierten Ratten. Von Frederiksen und Wilson (1971) wird der K_M-Wert des Enzyms in der Rattenprostata mit etwa 1 µM angegeben.

Androstendion: Für Androstendion fanden sich in der Literatur keine befriedigenden Angaben. Unter der Annahme, daß die Enzyme dieser Reaktionskette in den gleichen Konzentrationsbereichen arbeiten, wurde die gleiche Substratkonzentration wie für Testosteron verwendet.
Im gleichen Bereich liegen Steinberger und Ficher (1971) für Hodengewebe (2,47 µmol/l.). Eine vielfach geringere Konzentration benutzten Pérez et al. (1975) für Hypophysen (0,0083 µmol/l).

Die Inkubationszeit wurde auf 1 Stunde begrenzt. Nach Frederiksen und Wilson (1971) ist die Testosteron-Reduktionsrate bei 37°C nur bis etwa 70 min konstant.

2.4.2. Extraktion und Trennung der markierten Substanzen

Der Inkubationsvorgang wurde durch Beigabe des zehnfachen Volumens Äthylacetat beendet; dem Ester war eine Menge von jeweils 20 µg T, DHT, DELTA-4, DION, DIOL und Androsteron zugesetzt, die als Carrier für die nur in Spuren im Inkubat vorhandenen Substrate und deren Metaboliten dienen sollte. Vor der Zugabe des organischen Lösungsmittels wurde das Gewebe im Inkubationsglas mit einem eingepaßten Glasstab fein zerrieben.

Das Inkubat wurde mit dem Ester 10 min lang bei 175 upm durchgeschüttelt und anschließend mit 4000 upm zentrifugiert; der Überstand wurde abpipettiert. Der verbleibende Rest wurde dieser Prozedur ein zweites Mal unterzogen, anschließend wurden die Überstände vereinigt und verdampft.

Die Eintrockne wurde in zwei Gängen mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Das Substanzgemisch wurde in Äthylacetat gelöst, mit einer Eppendorf-Pipette (30 µl) bandförmig auf selbstbeschichtete Silicagel-Platten (Schichtdicke 0,3 mm) aufgetragen und in rechteckigen Trogkammern aufsteigend entwickelt.
Der erste Gang erfolgte auf 20 x 40 cm großen Platten in einem Fließmittelsystem aus Chloroform/Äthylacetat/Aceton 9/2/1 (v/v/v). Zur Identifizierung wurden parallel laufende Referenzsteroide durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht.
Die Wanderungsstrecke einer bestimmten Substanz ist bei Verwendung des gleichen Fließmittelsystems konstant. Die Substanz kann durch den Rf-Wert charakterisiert werden. Der Rf-Wert ist definiert als

$$Rf = \frac{\text{Entfernung des Fleck-Mittelpunktes vom Startpunkt}}{\text{Entfernung der Fließmittel-Front vom Start}}$$

Die Rf-Werte der hier bestimmten Steroide sind Tab. 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Rf-Werte der Referenzsteroide.
Angegeben sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung s.

	Zone	Steroid	Rf	s
1. Trennungsvorgang (native Steroide)	1	DIOL	0,25	0,01
	2	T	0,31	0,01
	3/4	DHT + A	0,39	0,02
	5	DELTA-4	0,47	0,02
	6	DION	0,56	0,02
2. Trennungsvorgang (acetylierte Steroide)	1a	DELTA-4	0,24	0,02
	2a	T	0,41	0,02
	3a	DHT	0,56	0,02
	4a	A	0,61	0,02
	5a	DIOL	0,70	0,02

Die Radioaktivität lokalisierte ein Radiochromatogramm-Scanner LH 2723 der Fa. Berthold (Wildbad). Über einen Dual-Ratemeter-Integrator Lb 242 K wurden die Impulse auf einen Zweikanal-Schreiber, Modell 232 übertragen. Platten- und Papiervorschub betrugen 300 mm/h. Der Zählschlitz maß 16 mm x 1 mm, als Zählgas wurde Methan 100 % verwendet. Die Zeitkonstante wurde bei 10 sec, die Measure Range bei 30 sec gewählt. Die Zählspannung wurde auf 900 V eingestellt. Abb. 5 gibt den Kurvenverlauf eines Radiochromatogramms wieder.

Die aus dem Farbchromatogramm der Referenzsteroide ermittelten Rf-Werte stimmten mit den aus dem Radiochromatogramm ermittelten überein. Daraus wurde auf die Identität der Substanzen geschlossen.

Mit Hilfe der Radiochromatogramme wurden die Bahnen in verschiedene Zonen eingeteilt, in deren Zentrum die Banden der jeweiligen Steroide lagen (Abb. 5).
Zone 'A' schließt die Startlinie und eine etwa 7 cm lange Strecke ein. Auf der Startlinie liegt der weitaus größte Anteil der Radioaktivität dieser Zone. Die Substanzen dieser Zone wurden nicht identifiziert. Aufgrund der kürzeren Wanderungsstrecke dürften sie eine höhere Polarität als die Substanzen der übrigen Zonen aufweisen.
In den folgenden Zonen 1 - 5 liegen Substanzen, die die gleichen Wanderungsstrecken wie die entsprechenden Referenzsteroide aufweisen (Abb. 5). Die beiden Steroide DHT und Androsteron (Zone 3/4) lassen sich in diesem Arbeitsgang nicht auftrennen, da ihnen eine sehr ähnliche Polarität zu eigen ist (s. Strukturformeln Abb. 2).
Zone 'e' umfaßt die Strecke oberhalb von Zone 6 bis zur Fließmittelgrenze. In ihr liegen nicht identifizierte Substanzen mit niedrigerer Polarität.

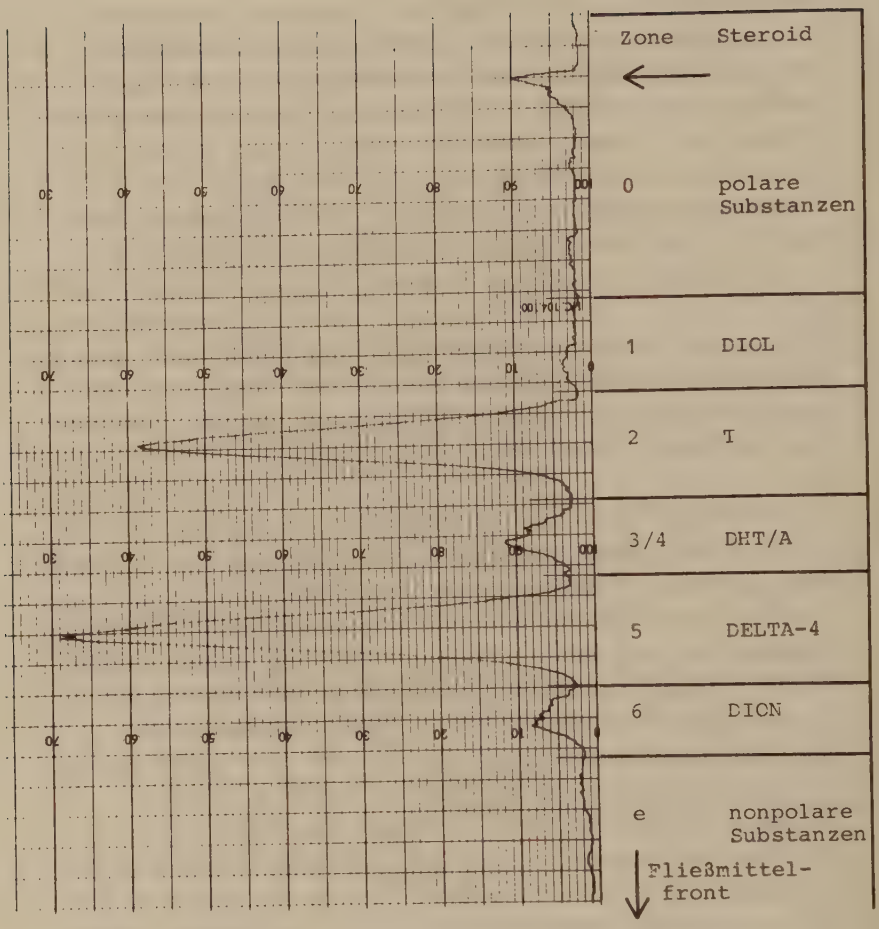


Abb. 5: Dünnschichtscanner-Diagramm
Dichteverteilung der Radioaktivität auf einer Bahn einer Chromatographieplatte (1. Trennungsgang).
Die Strecke Startlinie - Fließmittelfront beträgt in diesem Beispiel 38,1 cm (← Startlinie).

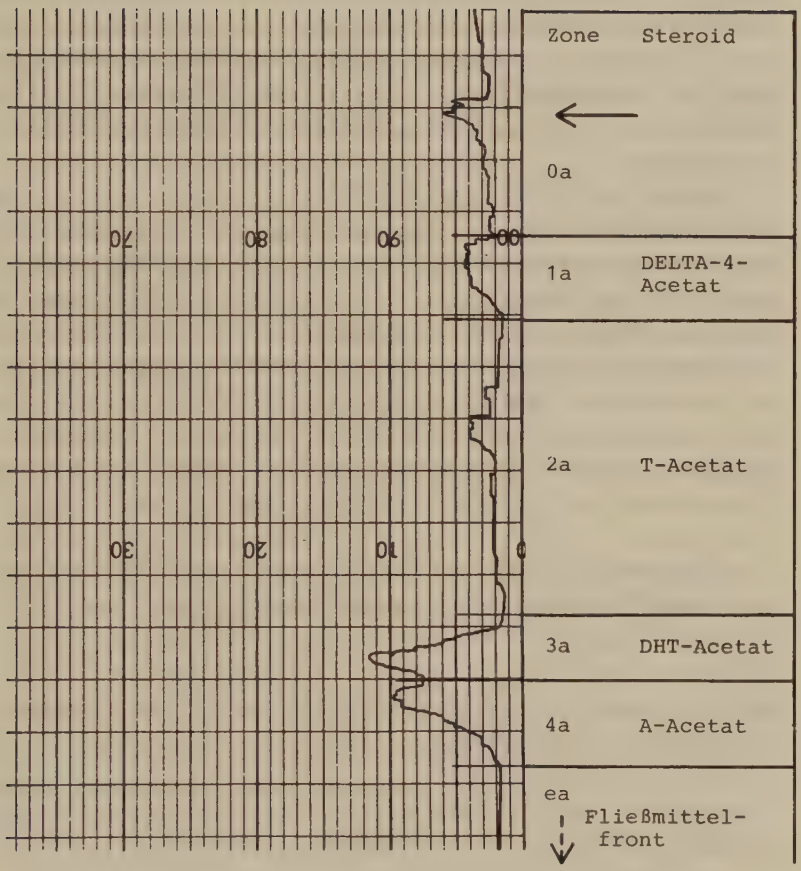


Abb. 6: Dünnschichtscanner-Diagramm (2. Trennungsgang)
Dichteverteilung der Radioaktivität nach Chromatographie der Acetate von Zone 3/4 des 1. Trennungsganges.
Die Strecke Startlinie - Fließmittelfront beträgt in diesem Beispiel 18,5 cm (⟵ Startlinie).

Die verschiedenen Zonen wurden unter einem Abzug abgeschabt und einzeln in Glastrichter mit Kristalleinsatz, sogenannte Fritten, gebracht. Zweimaliges Spülen mit 3 ml Äthylacetat löste die Steroide aus dem Gel. Das Eluat wurde verdampft und in 1 ml Äthanol gelöst. Ein Zehntel dieser Lösung (Aliquot) wurde mit 10 ml Szintillator (Quickszint 501) gemischt und in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler ausgezählt.

Um die beiden in Zone 3 liegenden Steroide zu trennen, wurde das betreffende Eluat nach Abnahme des Aliquot und Abdampfen des Äthanols mit je 100 µl Pyridin und Essigsäureanhydrid acetyliert und wiederum auf Silica-Gel-Platten (20 x 30 cm; 0,3 mm Schichtdicke) in einem Laufmittelsystem aus Benzol/Äthylacetat 4/1 (v/v) getrennt. Die Acetylierung ergab eine zufriedenstellende Trennung. Parallel laufende Acetate von DHT und A wiesen die gleiche Fließstrecke auf. Rf-Werte der Acetate sind Tab. 3 zu entnehmen.
Lokalisierung und Messung der Radioaktivität erfolgten wie oben. Ein Radiochromatogramm der Substanzen aus Zone 3/4 zeigt Abb. 6.

Auf die einzelnen methodischen Schritte wird im folgenden ausführlicher eingegangen.

2.4.2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Unter vielen brauchbaren Verfahren wie Säulen-, Papier- und Gelchromatographie ist für die Trennung von Steroiden die Dünnschichtchromatographie (DC) die "Methode der ersten Wahl" (Neher 1967) und erfordert im vorliegenden Aufgabenbereich den geringsten Aufwand an Zeit und Material.

Chromatographische Methoden arbeiten mit einem Zweiphasensystem, einer stationären Phase (Sorptionsmittel) und einer mobilen Phase (Fließmittelsystem). Die mobile Phase transportiert beim Durchwandern der Sorptionsschicht die einzelnen Substanzen eines aufgetragenen Gemisches mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, je nach Molekulargröße, Polarität usw. und führt so zu einer Trennung der Substanzen.

Für die DC stehen eine Vielzahl anorganischer und organischer Sorptionsmittel zur Verfügung, die in dünner Schicht auf einen Träger (Glasplatten, Aluminiumfolien) gebracht werden. Dem Silicagel kommt vor dem Aluminiumoxid- und Kieselgurpräparat wohl die größte Bedeutung zu. Es wird aus Polykieselsäure gewonnen und steht in verschiedenen Körnungen zur Verfügung.

2.4.2.1.1. Herstellung der DC-Platten

Material: Glasplatten aus Fensterglas (20 x 40 bzw. 20 x 20 cm, 2,8 bzw. 1,8 mm dick)
Kieselgel (Silicagel) Typ 60 G (enthält Gips als Bindemittel)

3 große bzw. 5 kleine Glasplatten werden in die Halteschablone (Shandon-Schiene) eingeschoben, mit einer kleinen Platte (20 x 10 cm) als Vorspann. Ein eingebautes aufblasbares Luftkissen fixiert die Platten von unten am Halterrahmen. Mit einem acetongetränkten Tuch werden die Platten entfettet. Das Streichgerät wird mit einer geeichten Metallschablone auf die gewünschte Strichdicke eingestellt, auf den Vorspann aufgesetzt und mit einer Aufschlämmung von 60 g Kieselgel in 120 ml Wasser gefüllt. Mit gleichmäßigem Zug wird nun die Gelsuspension aufgezogen. Nach 30 min Lufttrocknung kann man die Beschichtung gut beur-

teilen und unregelmäßige Platten aussortieren. Ist die Schicht abgetrocknet, werden die Platten in ein Gestell geschoben, in einem Trockenschrank bei 110°C für 30 min aktiviert (in senkrechter Stellung) und anschließend in einem luftdichten Behälter über hygroskopischem Blaugel aufbewahrt. Mit einem spitzen Holzstift deutet man die Startlinie an (15 mm von der Unterkante) und ritzt 6 Bahnen von 2 cm Breite. Diese Begrenzungslinien der Bahnen müssen bis zur Glasplatte durchgehen, um ein kapillares Auslaufen der Auftragelösung über das Startband hinaus zu verhindern. Die Linien wurden mit einer selbstgefertigten Holzschablone gezogen. Die seitlichen Randbereiche der Schicht wurden nicht benutzt.

2.4.2.1.2. Auftragen

Die Extrakte eines Probenansatzes wurden in 100 µl Äthylacetat gelöst und nach Schütteln mit dem Rota-Mixer mit einer Eppendorf-Pipette (30 µl) bandförmig auf eine Bahn einer Chromatographieplatte aufgetragen. Weitere 50 µl Äthylacetat dienten zur Spülung des Glases und wurden auf die gleiche Weise aufgetragen.
Um 150 µl Lösung aufzubringen, ist mehrmaliges Auftragen erforderlich. Das Lösungsmittel muß bis zum nachfolgenden Auftragungsgang abgedampft sein, was mit einem Luftstrom aus einem Föhn beschleunigt wurde. Das gute Gelingen eines Bandchromatogramms hängt von einem gleichmäßigen Aufbringen ab.
Auf die erste und die letzte Bahn einer Platte wurde ein Gemisch von 6 Referenzsteroiden aufgetragen.

2.4.2.1.3. Entwickeln

Angewandt wurde die aufsteigende Entwicklung in einer rechteckigen Trogkammer, die 4 große DC-Platten faßte. Eine gute Kammersättigung ist notwendig, um das sogenannte Randphänomen zu verhindern. Dieses bezeichnet den Umstand, daß die Substanzen zum Rande der Platte hin höher wandern als in der Mitte, da das Fließmittel im Randbereich bei unzulänglicher Sättigung der Kammer stärker abdampft. Eine gute Sättigung erhält man, indem man die Wände der Kammer rundherum mit Filterpapier, wie es zur Papierchromatographie verwendet wird, auskleidet und zusätzlich 2 Blatt Filterpapier wie zur absteigenden Entwicklung in mit Fließmittel gefüllten Glasrinnen aufhängt. Sehr wichtig ist natürlich ein luftdichter Abschluß des Glasdeckels, dessen Schliff mit Silikongel zur Abdichtung bestrichen wird. Die Kammer darf keiner Sonnenbestrahlung und keinem Luftzug ausgesetzt sein, der zu einseitiger Temperaturdifferenz führt. Besonders bei der großen Kammer muß auf eine genau waagerechte Aufstellung geachtet werden, damit die gleiche Eintauchtiefe (etwa 0,5 cm) auf der ganzen Breite der Platte gewährleistet ist.
Da die einzelnen Komponenten des Fließmittels eine ungleiche Flüchtigkeit aufweisen, ist darauf zu achten, daß möglichst wenig abdampft und das Fließmittel regelmäßig erneuert wird.
Die Platten wurden eine halbe Stunde in einem klimatisierten Chromatographieraum gelagert, bevor sie in die Kammer gestellt wurden. Die Entwicklungszeit betrug etwa 270 min für die großen bzw. 50 min für die kleinen Platten. Die Laufmittelfront wurde etwa 3 bzw. 1 cm unter dem Plattenoberrand markiert. Nach dem Entwickeln ließ man das Fließmittel unter dem Abzug abdampfen und besprühte anschliessend die Referenzbahnen mit Phosphomolybdat-Lösung (10 %

in Isopropanol), was eine blaue Farbreaktion auf gelbem Grund ergibt. Die Lösung wurde mit einem dreiteiligen Gerät vom Typ "Spray Gun" aufgesprüht. Die "heißen" Bahnen wurden zum Schutz mit einer Glasplatte abgedeckt.

2.4.2.1.4. Acetylierung

In bestimmten Fällen sind Derivate besser trennbar als die freien Substanzen selbst. Diese Tatsache wurde für die Trennung der Substanzen aus Zone 3/4 ausgenutzt. Nachdem vom Eluat des 1. Ganges ein Aliquot zur Auszählung abgenommen war, wurden die restlichen 900 µl wieder eingedampft und über Nacht mit 100 µl Acetanhydrid in 100 µl Pyridin verestert. Wegen des stechenden Geruchs wurden diese Zusätze unter dem Abzug beigegeben und das Glas mit einem geschliffenen Stopfen verschlossen. Auf einem Rotamixer wurde gut durchgeschüttelt.
Bei dieser Reaktion werden alle primären und sekundären Hydroxylgruppen acetyliert (mit Ausnahme der sterisch gehinderten 11-beta-Hydroxylgruppe).

2.4.3. Messung der Radioaktivität

Die zur Lokalisation der einzelnen Peaks angefertigten Scanner-Diagramme konnten nicht für quantitative Aussagen herangezogen werden, da "die direkte Aktivitätsbestimmung auf der Trennschicht wegen starker Selbstabsorption der Strahlung und wegen der 'Weichheit' des (Glas-) Untergrunds unempfindlich und als quantitatives Verfahren nicht zuverlässig" ist (Mangold 1967). Deshalb wurde die Flüssigkeits-Scintillationszählung angewandt, die anderen radiometrischen Bestimmungsmethoden hinsichtlich Zuverlässigkeit und Genauigkeit überlegen ist.
Die Substanzen wurden nach Elution aus dem Sorptionsmaterial und anschließender Evaporation in 1 ml Äthanol gelöst. Ein Aliquot von 0,1 ml wurde in 10 ml Scintillationsflüssigkeit gegeben. Eine durch diese Menge Äthanol ausgelöste Störung der Flüssigkeits-Scintillationszählung (Quench-Effekt) ist vernachlässigbar (eigene Messungen).
Mit dem Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer wurden die Zerfallsäquivalente der mit Tritium und Carbon 14 markierten Substanzen bestimmt. Das Gerät hat zwei Meßkanäle, in denen die spectrometrische Breite (window) von 0 - 1000 und die Verstärkung (gain) von 0 - 100 % getrennt eingestellt werden kann. Die gleichzeitige Bestimmung beider Isotopen aus einem Gemisch ist aufgrund der unterschiedlichen Strahlungsenergie möglich.*)

Durch Messungen mit Standardproben (^{14}C-Toluol, ^{3}H-Toluol) wurde die bestmögliche Kombination aus guter Verstärkung und geringer Überlagerung der Spektralbereiche ermittelt.

*) ^{3}H: Maximale Energie 0,018 MeV
^{14}C: Maximale Energie 0,155 MeV

Mit folgenden Einstellungen wurden sämtliche Proben dieser Studie gemessen:

Kanal 1 (Tritium)	Kanal 2 (Carbon 14)
Gain 50 %	Gain 9 %
Window 50 - 225	Window 225 - 1 000

Auf diese Weise wurde keinerlei Tritiumaktivität in Kanal 2 gemessen. In Kanal 1 wurde infolge der höheren Strahlungsenergie von Carbon 14 eine Einstreuung von 10,4 % ± 0,4 % der in Kanal 2 gemessenen Carbon-14-Aktivität registriert. Dieser Wert wurde unter Verwendung des Standards ermittelt. Die Berücksichtigung der Einstreuung bei der Auswertung wird im Abschnitt "Ergebnisberechnung" dargelegt.
Die Hintergrundstrahlung (background) wurde anhand von Leerproben ermittelt und nach Eingabe in den Zähler automatisch subtrahiert. Die Zählausbeute (efficiency), gemessen am internen Standard, betrug 51 % ± 0,4 % für Carbon 14 und 27 % ± 0,4 % für Tritium.
Die Proben wurden 10 min lang gezählt und die Werte als counts pro 10 min ausgedruckt. In jeder Meßserie wurden die Standards mitgeführt, um bei eventuellen Schwankungen einen Korrekturfaktor zu erhalten.
Die Aktivitäten des Inkubationsmediums lagen bei 3×10^5 counts pro 10 min (^{14}C) bzw. bei 10^7 counts pro 10 min (^{3}H).

2.5. Radioimmunoassay (RIA)

Die Bestimmung der Serum-Gonadotropine erfolgte aus dem Stammblut, das jeweils von allen Tieren einer Probe gesammelt, vereinigt und nach 1 - 2 stündiger Gerinnungszeit zentrifugiert wurde. Das Serum wurde abpipettiert und bis zur Untersuchung bei -15°C eingefroren.

Der Radioimmunoassay wurde mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dipl. Biochemiker Dr. med. W. Blum nach den Richtlinien des NIAMDD*), Rat Pituitary Hormone Distribution Program, durchgeführt.

Das Testbesteck des NIAMDD enthielt den 1. Antikörper (Kaninchen-gegen-rLH- bzw. -rFSH-Antikörper), als Standard die Referenzpräparation 1 (rLH-RP 1 bzw. rFSH-RP 1) und gereinigtes rLH bzw. rFSH, das mittels der Chloramin T-Methode nach Greenwood, Hunter und Glover (1963) mit J^{125} jodiert wurde. Der 2. Antikörper (Esel-gegen Kaninchen-IgG-Antiserum) wurde von den Wellcome Laboratories (GB) bezogen. (Ausführlichere Informationen zur Technik des RIA s. Monroe et al. 1968, Eckert 1976).

2.5.1. Reagenzien

Lösung A: Diluent: 1 % bovines Serumalbumin (BSA) in PBS-Acid

B: P3R: Phosphatpuffer mit NaCl (PBS)
EDTA 50 mM
3 % normales Kaninchenserum

C: 1. Antikörper: spezifischer Kaninchen-gegen-rLH (-rFSH)-Antikörper
verdünnt in P3R 1: 10 000 (1: 2 500)

D: Tracer: jodiertes reines rLH (rFSH) in Diluent so gelöst, daß die Aktivität in 100 µl 10 000 cpm beträgt

E: 2. Antikörper: Esel-gegen-Kaninchen-IgG-Antiserum, verdünnt mit Diluent 1 : 12

*) National Institut for Arthritis, Metabolism and Digestive Deseases, Bethesda MD., USA

F: Referenzpräparation 1 : rLH-RP 1 (rFSH-RP1)
Aus diesem Präparat wurde mit Diluent eine Verdünnungsreihe von 500 bis 2,5 ng in solchen Zwischenstufen hergestellt, daß eine Standardkurve gezeichnet werden konnte.

2.5.2. Prozedur

In Assayröhrchen (Plastik-Reagenzröhrchen zum Einmalgebrauch) wurden die Serumproben (200 µl) bzw. die Verdünnungsreihe der Lösung F, Diluent ad 300 µl und 200 µl der Lösung C (1. Antikörper) pipettiert. Die Mischung wurde auf einem Rotamix-Schüttler kurz aufgeschüttelt und über 24 h bei 4°C inkubiert.
Nach Zugabe von 100 µl Lösung D (Tracer) wurde wieder geschüttelt und einen Tag lang im Kühlraum inkubiert. 200 µl Lösung E (2. Antikörper) wurde zugegeben, aufgeschüttelt und für 3 Tage kühlgestellt.
Danach wurde über 30 min bei 2 000 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen. Zum Präzipitat wurde 1 ml kaltes PBS-Acid gegeben, aufgeschüttelt und nochmals bei 2 000 g über 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen.
Das verbleibende Präzipitat wurde im Gammazähler gezählt. Aus der Verdünnungsreihe der Referenzpräparation wurde eine Standardkurve (Abb. 7 u. 8) erstellt, mit deren Hilfe die Werte der unbekannten Proben ermittelt werden konnten. Die Ergebnisse wurden als µg NIAMDD-rLH (-rFSH) -RP 1 pro Liter Serum ausgedrückt.

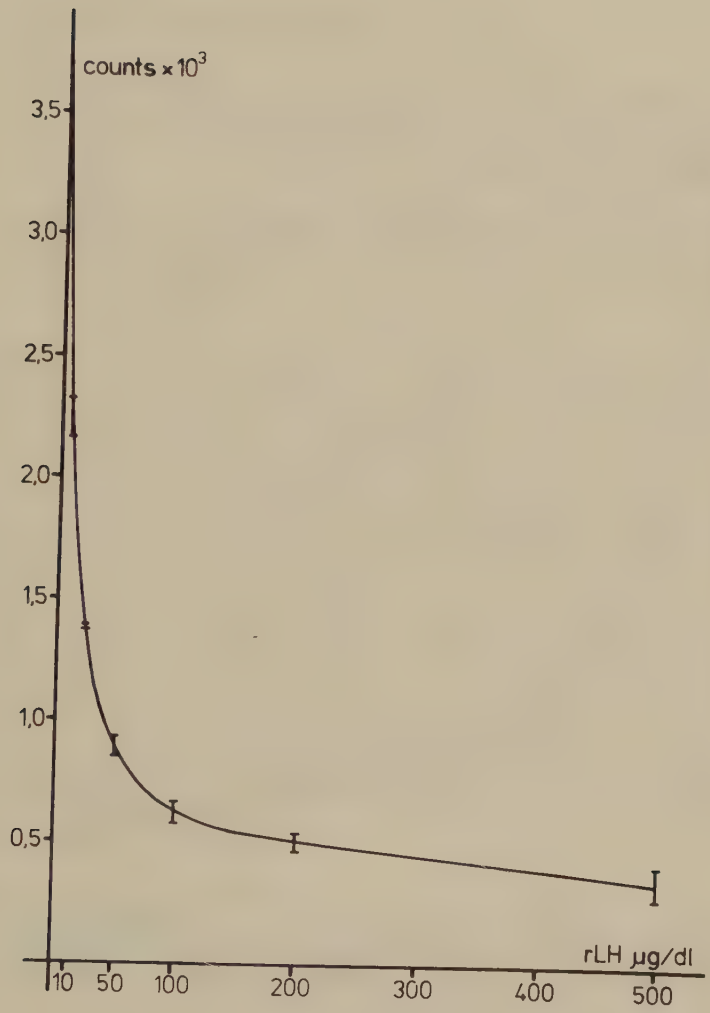


Abb. 7: Standardkurve für rLH.
Dargestellt ist die registrierte Radioaktivität in counts/3 min gegen die Standardhormonmenge.

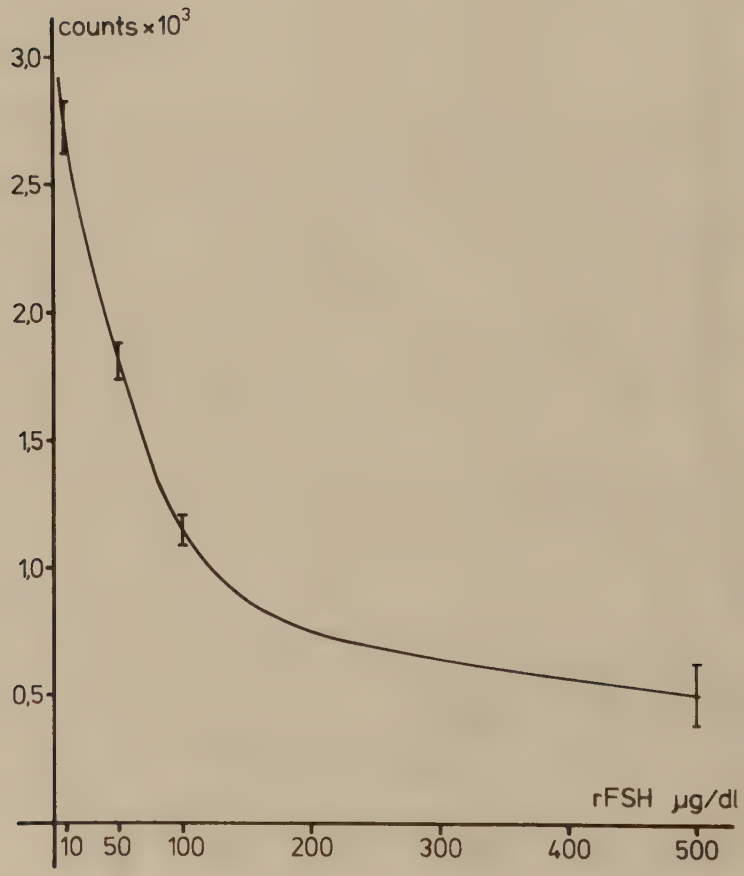


Abb. 8: Standardkurve für rFSH
Dargestellt ist die registrierte Radioaktivität in counts/3 min gegen die Standardhormonmenge.

2.6. Validität der Methode

2.6.1. Leerproben und Reinheitskontrolle

1. Die Auftrennung eines Gemisches von Referenzsteroiden (T, DELTA-4, DHT, DIOL, DION, A) wurde durch eine Farb-Reaktion sichtbar gemacht und die Rf-Werte wurden bestimmt.
2. Mit Hilfe des Scanner-Diagramms wurden die Laufstrecken bzw. die Rf-Werte der Substanzen der Probenansätze bestimmt.

Die Zuordnung der Substanzen zu den einzelnen Referenzsteroiden geschah durch den direkten Vergleich der Scannerdiagramme mit den Farbchromatogrammen ein und derselben Chromatographieplatte. Eine genauere Bestimmung der Substanzen, z. B. durch Rekristallisierung der einzelnen Steroide bis zu einer konstanten spezifischen Aktivität, war aufgrund der begrenzten Möglichkeiten, die für diese Studie zur Verfügung standen, nicht durchführbar.
Das Referenzgemisch enthielt die Produkte der Hauptstoffwechselwege von T bzw. DELTA-4. Die Bildung von anderen Metaboliten durch Hypophysengewebe, wie z. B. Epitestosteron, Testosteron-Sulfat, 19-OH-Testosteron, 19-OH-Androstendion oder Östrogenen, ist entweder nicht zu erwarten oder liegt außerhalb der Nachweismöglichkeiten der angewandten Methode.

Zur Kontrolle der Reinheit der einzelnen Zonen wurden Leerproben mitgeführt. Diese enthielten 300 µl Inkubationsmedium mit den beiden radioaktiven Substraten ohne Gewebe. Sie durchliefen alle methodischen Schritte wie die anderen Versuchsansätze. Nach der ersten chromatographischen Trennung wurden die Zonen entsprechend den Referenzsteroiden und unter Zuhilfenahme der Scanner-Diagramme eingeteilt. Das Eluat der Zone 3/4 wurde acetyliert und ein zweites Mal chromatographiert.

Die Ergebnisse der Leerproben sind Tab. 4 zu entnehmen. In Zone 2 (Testosteron) liegen 97,9 % der gesamten 14C-Aktivität, in Zone 5 (Androstendion) liegen 95,8 % der gesamten 3H-Aktivität. Die Kontamination der unspezifischen Zonen beträgt weniger als 1 % mit Ausnahme von Zone 0 (Startlinie). Die mit "a" bezeichneten Zonen weisen nach Acetylierung und zweitem Trennungsgang so gut wie keine Kontamination auf. Die relativ hohe Tritium-Aktivität in Zone 6 könnte durch die weitere Laufstrecke des DELTA-4-Peaks erklärt werden: Durch eine große Laufstrecke wird die Peak-Basis breiter.
Die Werte von Zone 0 mögen auf Verunreinigungen zurückzuführen sein.

Tab. 4: Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Zonen bei Leerproben ohne Gewebe (n = 3). Zuordnung der Zonen siehe Abb. 5/6. Zone 2 entspricht dem ^{14}C-Testosteron-Peak, Zone 5 dem ^{3}H-Androstendion-Peak. Gesamtradioaktivität einer Bahn entspricht 100 %.

Zone	Substanz	Aktivität (%) Carbon 14	Tritium
0		0,87	2,01
1		0,61	0,19
2	^{14}C-T	97,89	0,43
3a		0,07	0,02
4a		0,04	0,01
5	^{3}H- -4	0,35	95,84
6		0,11	0,99
e		0,06	0,50

Tab. 5: Variation von Meßwerten innerhalb einzelner Versuchszellen am Beispiel der mit NaCl behandelten Tiere.
Angegeben ist der Variationskoeffizient v in %.
Ein "a" hinter der Zonenbezeichnung bedeutet Berechnung des Wertes nach Acetylierung und zweitem DC-Durchgang.

Aktivität	Zone	20 Tage n = 6	35 Tage n = 5	50 Tage n = 6	90 Tage n = 6	Leerproben n = 3
Carbon ^{14}	0	8,2	21,8	32,2	44,4	12,4
	1	22,0	36,7	22,4	125,3	96,1
	2	1,4	1,6	2,7	2,7	0,5
	3a	15,0	23,1	15,0	52,6	85,3
	4a	111,8	79,3	97,4	73,3	68,6
	5	19,7	53,3	31,8	64,0	70,3
	6	25,0	60,5	41,9	80,0	84,0
	e	29,6	32,1	25,0	50,0	18,2
Tritium	0	6,4	17,4	14,2	20,2	39,6
	1	18,9	42,9	16,2	41,9	72,4
	2	14,0	25,4	14,3	34,1	117,2
	3a	22,9	33,9	34,0	33,3	24,7
	4a	50,7	45,2	31,1	30,8	43,3
	5	1,6	3,4	1,9	1,4	1,6
	6	14,7	49,7	19,3	26,9	43,7
	e	26,7	30,1	16,7	27,2	76,7

2.6.2. Präzision

Für den Methodenteil der Biokonversion wird als Maß für die Präzision die Variation einer Zone innerhalb einer Versuchszelle mit sechs Proben angegeben. Tab. 5 enthält die Variationskoeffizienten aus der Versuchsreihe der mit NaCl behandelten Tiere. Beim Vergleich mit den Meßwerten wird deutlich, daß die Schwankungen um so höher sind, je kleiner der Meßwert ist. In den substratspezifischen Zonen mit hohen Meßwerten ist die Variation sehr gering.

Unter Berücksichtigung der Radioaktivitätsverteilung bei den Leerproben muß folgende Einschränkung gemacht werden: Meßergebnisse von ^{3}H-Aktivität in den Zonen 2 und 6 bzw. von ^{14}C-Aktivität in den Zonen 1 und 5 können nur bei einem Wert von über 1 % auf biologische Prozesse zurückgeführt werden.

2.6.3. Recovery

Zur Bestimmung der Recovery wurde die nach dem ersten Chromatographiedurchgang wiedergefundene Gesamtradioaktivität eines Probenansatzes ermittelt und als prozentualer Anteil der zu Beginn des in vitro-Versuches beigegebenen Radioaktivität (beides in counts/Zeiteinheit) berechnet. Es ergaben sich folgende Werte:

Wiedergefundene Tritium-Aktivität: 79,0 % ± 8,0 %
Wiedergefundene Carbon-14-Aktivität: 81,3 % ± 11,6 %

Ebenso wurde die Recovery nach dem zweiten Chromatographiedurchgang bestimmt. Bezugswert war hier jedoch die Radioaktivität der Zone 3/4 nach dem 1. Durchgang.

Wiedergefundene Aktivität nach dem 2. DC-Durchgang:

Tritium-Aktivität: 78,6 % ± 6,6 %
Carbon-14-Aktivität: 91,3 % ± 10,2 %

2.7. Auswertung

2.7.1. Ergebnisberechnung

Die Werte der Radiometrie wurden als "Counts pro 10 min" erhalten und für beide Isotopen getrennt ausgedruckt. Die durch die Überschneidung des Strahlungsspektrums bedingte Einstreuung von Radiocarbon in den Tritium-Kanal wurde mit Hilfe des internen Standards für jede Meßserie ermittelt. Die Einstreuung wurde als Anteil in Prozent des Meßwerts im ^{14}C-Kanal ausgedrückt. Dabei wurde der Meßwert des ^{14}C-Standards im Radiocarbon-Kanal gleich 100 % gesetzt und der prozentuale Anteil der im Tritium-Kanal gezählten Counts berechnet. Bei den Proben wurde dieser Prozentsatz der Counts im Radiocarbon-Kanal von den Counts im Tritium-Kanal subtrahiert.
Die wiedergefundene Radioaktivität wurde durch Summation der Counts der Zonen 0 bis e bestimmt und als 100 % gesetzt. Die Einzelwerte der zweiten Dünnschichtchromatographie wurden auf den Prozentwert der entsprechenden Zonen des ersten Trennungsganges zurückgerechnet. Zone 0a wurde dabei der Zone 0 zugeschlagen.
Die Ergebnisse geben die prozentualen Mengenverhältnisse der während der Biokonversion anfallenden Steroide unter Einbeziehung nicht identifizierter Substanzen an.

2.7.2. Statistische Datenauswertung

Der multiple t-Test war wegen der Nichtorthogonalität zahlreicher Vergleiche nicht geeignet. Deshalb wurde als

statistisches Verfahren der Wahl eine zweifaktorielle Varianzanalyse (gekreuzter Versuchsplan) durchgeführt. Der Versuchsplan umfaßte 16 Zellen (4 Altersstufen, 4 Versuchsreihen mit verschiedener Behandlung), die mit n Versuchsansätzen (Proben) wie folgt besetzt waren (Tab. 6):

Tab. 6: Anzahl n der Versuchsansätze in den einzelnen Zellen des Versuchsplanes. In den Zellen sind die Altersstufen (Alter in Tagen), in den Spalten die Behandlungsreihen (NaCl = N, LHRH = L, superaktives LHRH-A, Dosierung 1 = S, superaktives LHRH-A, Dosierung 2 = SS) aufgeführt.

Behandl. Alter	N	L	S	SS	Zeilen-summe
20	6	6	6	6	24
35	5*	6	5*	6	22
50	6	6	6	6	24
90	6	6	6	6	24
Spalten-summe	23	24	23	24	Gesamtzahl der Proben 94

* 1 Versuchsansatz verloren

Die beiden Voraussetzungen für die Durchführung der Varianzanalyse waren gegeben:

1. Normalverteilung wurde mit einem von SACHS angegebenen Schnelltest überprüft. Dabei ergab sich, daß diese in so gut wie allen Fällen erfüllt war.

2. Varianzhomogenität ließ sich in der Mehrzahl der Fälle mit dem BARTLETT-Test sichern.

Zum Vergleich der einzelnen Zellen wurde der SCHEFFE-Test, ein nichtorthogonales, aposteriorisches Verfahren eingesetzt. Die mit diesem Test erhaltenen Signifikanzen sind nur bei einem signifikanten F der Haupteffekte relevant.

Bezeichnung angeführter statistischer Größen

Anzahl der Versuchsansätze (Proben): n

arithmetischer Mittelwert: $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} x_i$

Standardabweichung: $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$

mittlerer Fehler des Mittelwertes: $s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$

Variationskoeffizient: $v = 100 \frac{s}{\bar{x}} \%$

Die Durchführung der statistischen Berechnungen besorgte freundlicherweise Herr Dipl. Biochemiker Dr. med. Bernd Blank.

3. ERGEBNISSE

Die Signifikanzen der Einzeleffekte sind Tab. 7 zu entnehmen.

Tab. 7: Ergebnis der Statistischen Datenauswertung
Signifikanzen der Einzeleffekte

	Alterseffekte		Behandlungseffekte	
LH	0,001		0,001	
FSH	0,001		0,001	
	Carbon 14	Tritium	Carbon 14	Tritium
T	0,001	0,001	0,384	0,999
DHT	0,001	0,001	0,193	0,331
DIOL	0,001	0,001	0,999	0,145
DELTA-4	0,001	0,001	0,999	0,067
A	0,001	0,001	0,189	0,064

3.1. Gonadotropine im Serum

3.1.1. LH

Es zeigen sich hochsignifikante Alters- und Behandlungseffekte (Abb. 9 u. 10).

Bei der Kontrollgruppe, die mit NaCl behandelt wurde, werden Werte zwischen 10 und 40 µg/l gefunden. Die Serumspiegel steigen kontinuierlich mit dem Alter an. Bezogen auf die Werte der 20 Tage alten Tiere steigt der Serumspiegel bei den pubertären Tieren auf das 2 1/2- bis 3-fache, bei den erwachsenen Tieren auf das 3 1/2-fache. Bei der mit LHRH behandelten Gruppe liegen die Durchschnittswerte zwischen 116 und 237 µg/l. Hier ist der Spiegel bei den pubertären Tieren signifikant höher als bei den präpubertären und erreicht im Vergleich mit letzteren knapp den doppelten Wert. Hingegen reagieren die erwachsenen Tiere im Verhältnis schwächer und bleiben noch unter den präpubertären.
Ganz ähnlich sind die Alterseffekte bei der mit der schwächeren Dosierung des LHRH-A behandelten Gruppe, wogegen die höhere Dosierung des Analogen deutliche Unterschiede zeigt. Hier erreichen die präpubertären Tiere das gleiche Niveau wie die pubertären, die erwachsenen Tiere bleiben jedoch weit zurück.

In Abb. 10 werden die durch die verschiedenen Behandlungen hervorgerufenen statistischen Unterschiede verdeutlicht. Es erfolgt auf LHRH-Gabe bei den 20 Tage alten Tieren ein deutlicher, ca. 12-facher, bei den 35 und 50 Tage alten Tieren ein hochsignifikanter ca. 8-facher Anstieg des LH-Serumspiegels gegenüber der Kontrollgruppe. Die Gabe von LHRH-A in niederer Dosierung erzeugt Serumspiegel in vergleichbaren Bereichen wie das Mutterhormon, während die hohe Dosierung bei den pubertären Altersgruppen einen

deutlichen, bei den 20 Tage alten Tieren einen hochsignifikanten weiteren Anstieg hervorruft. Die so stimulierte LH-Konzentration der 20 Tage alten Tiere erreicht mit 390 µg/l den Bereich der pubertären Altersstufen. Bei den erwachsenen Tieren hingegen hat die höhere Dosierung keinen steigernden Effekt.

3.1.2. FSH

Die FSH-Serumspiegel lassen ebenfalls hochsignifikante Alters- und Behandlungseffekte erkennen (Abb. 11 u. 12).

Anders als bei LH zeigt sich bei FSH ein scharfer Anstieg der Serumspiegel auf 366 µg/l zu Beginn der Pubertät, entsprechend etwa 350 % des Wertes bei erwachsenen Tieren. Die Werte der spätpubertären Tiere liegen dazwischen mit einer um etwa 210 % höheren Konzentration. Die 20 Tage alten Tiere weisen sehr niedrige Serumkonzentrationen von 6 µg/l auf.
Nach Stimulation mit Releasing Hormonen bleibt dieser Altersverlauf erhalten. Die juvenilen Tiere erreichen dabei die Spiegel der erwachsenen Tiere und übertreffen diese noch um nahezu das Doppelte in der SS-Reihe.

Eine kontinuierliche Zunahme des Behandlungseffektes wird bei den 20 und 35 Tage alten Tiere gemessen. Die Serumkonzentrationen nach Gabe des analogen Hormones sind signifikant höher als bei der Kontrollgruppe.
Bei den beiden höheren Altersstufen findet sich auch eine signifikante Zunahme nach Stimulation, die hohe Dosierung des Analogen erzeugt aber keine weitere Steigerung, sondern eher niedrigere Werte als das Mutterhormon.

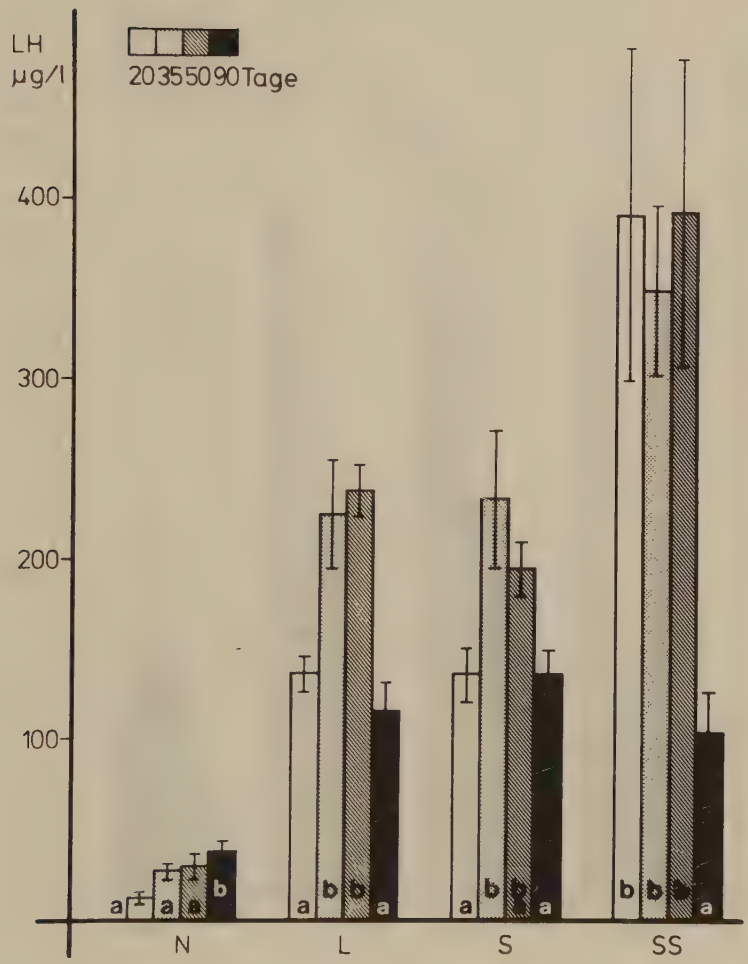


Abb. 9: LH-Serumspiegel: Alterseffekte in den Behandlungsreihen N, L, S und SS.
Die Konzentrationsangabe bezieht sich auf NIAMDD-rLH-RP 1. Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Behandlungsgruppe hochsignifikant ($p \leq 0{,}001$).
Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

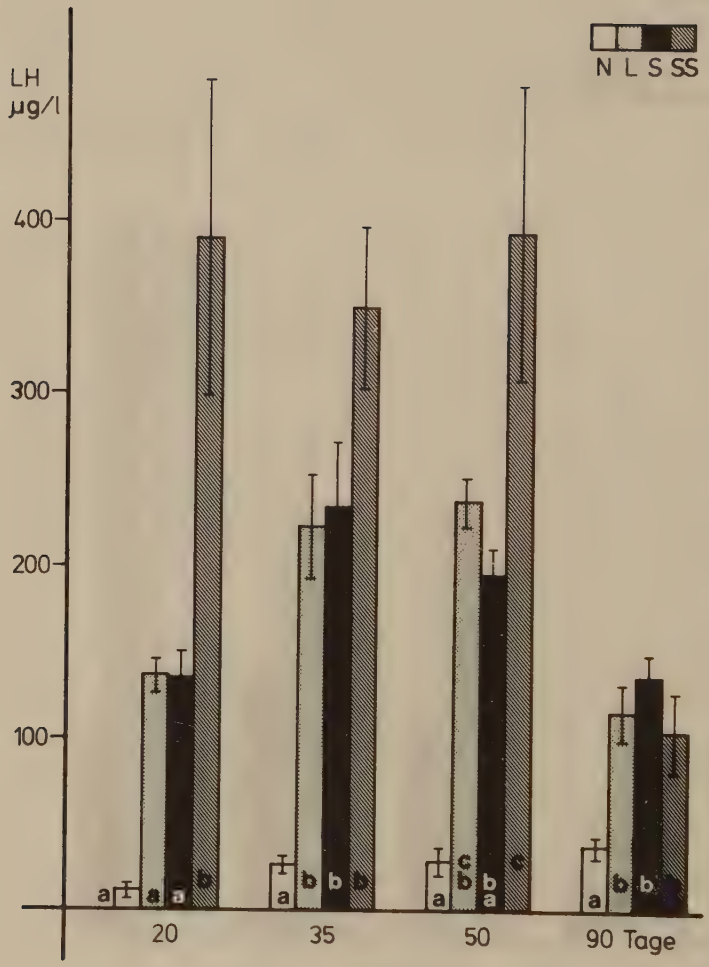


Abb. 10: LH-Serumspiegel: Behandlungseffekte in den Altersstufen 20, 35, 50 und 90 Tage.
Die Konzentrationsangabe bezieht sich auf NIAMDD-rLH-RP1. Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Altersstufe hochsignifikant ($p < 0{,}001$).
Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

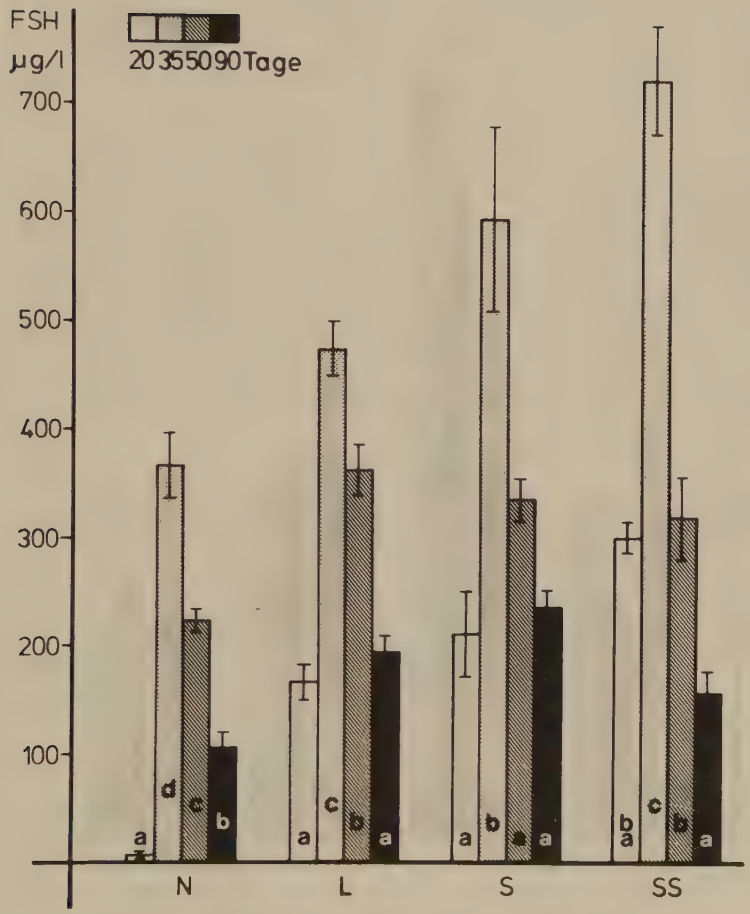


Abb. 11: FSH-Serumspiegel: Alterseffekte in den Behandlungsreihen N, L, S, SS.
Die Konzentrationsangabe bezieht sich auf NIAMDD-rFSH-RP1. Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Behandlungsgruppe hochsignifikant ($p < 0{,}001$).
Als Disperionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

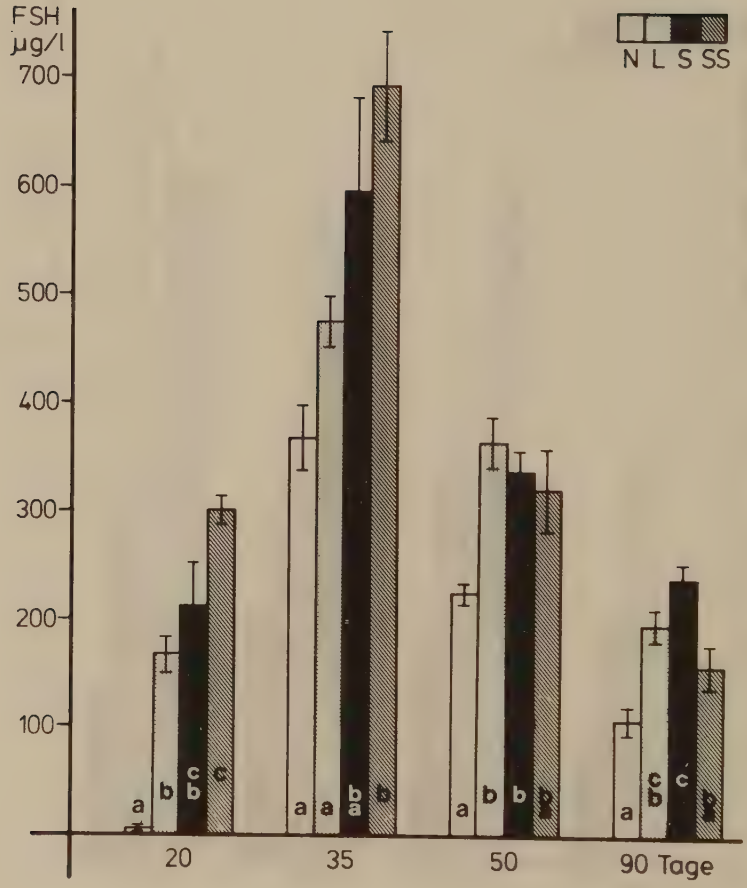


Abb. 12: FSH-Serumspiegel: Behandlungseffekte in den Altersstufen 20, 35, 50 und 90 Tage.
Die Konzentrationsangabe bezieht sich auf NIAMDD-rFSH-RP1.
Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Altersstufe hochsignifikant ($p < 0{,}001$).
Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

3.1.3. Zusammenfassung

Der unbeeinflußte LH-Serumspiegel ist stets gering im Vergleich mit den stimulierten Spiegeln; er steigt kontinuierlich mit dem Alter an. Die intraperitoneale Gabe von LHRH wird von der juvenilen Altersstufe mit einem 12-fachen, von den pubertären Altersstufen mit einem 8-fachen, von der adulten Altersstufe mit einem 3-fachen Anstieg der Serumspiegel beantwortet. Die Gabe des analogen Hormons in schwacher Dosierung erzeugt Spiegel, die mit denen nach LHRH-Stimulation vergleichbar sind. Im Vergleich dazu findet man nach hoher Dosierung des analogen Hormons eine weitere Erhöhung der Konzentration um das eineinhalb- bis zweifache bei den unreifen Tieren, während bei den erwachsenen Tieren kein weiterer Anstieg zu verzeichnen ist.

Im Gegensatz zum LH weist der native FSH-Spiegel deutliche Schwankungen im Entwicklungsalter mit einem Gipfel zu Beginn der Pubertät auf. Hier erreicht bzw. übersteigt er sogar die stimulierten Spiegel der anderen Altersstufen. In der frühpubertären Altersstufe zeigt sich die maximale Stimulierbarkeit durch die Releasing Hormone.

3.2. Biokonversion von Testosteron und Androstendion

Bei der Biokonversion der Androgene in der Hypophyse werden nennenswerte Signifikanzen nur bei den Alterseffekten gefunden (Tab. 7). Die Behandlung hatte also keine eindeutigen Einfluß auf die Biokonversion bei der hier angewandten Methode.
Die Beschreibung der Ergebnisse bezieht sich aufgrund der primär vorhandenen Alterseffekte im wesentlichen auf die Gruppe der mit NaCl behandelten Tiere.

3.2.1. Radiokohlenstoffmarkierte Substanzen

3.2.1.1. Substratumbau: Testosteron (Abb. 13)

Der geringste Anteil des wiedergefundenen Substrats Testosteron wird bei den pubertären Altersstufen gemessen. Er beträgt 85,3 % bei den 35 Tage alten Tieren und 84,3 % bei den 50 Tage alten Tieren. Der Anteil bei den 20 Tage alten Tieren beträgt 88,4 % und ist signifikant höher als in der Altersstufe 50. Die Altersstufe der erwachsenen Tiere unterscheidet sich statistisch eindeutig von den anderen Altersstufen mit dem höchsten Anteil von 95,1 %. Die Differenz dieser Werte zu 100 % kann mit den im Abschnitt 2.5.2. besprochenen Einschränkungen als Maß für die Verstoffwechslungsrate des Substrats während der Inkubation angesehen werden.
Die Summe aller identifizierten Metaboliten beträgt in den einzelnen Altersstufen 8,6 % (20 Tage), 11,7 % (35 Tage), 13,4 % (50 Tage) und 3,4 % (90 Tage).
Die prozentual höchste Verstoffwechslungsrate wird somit bei den pubertären Tieren vorgefunden. Die Hypophysen erwachsener Tiere zeigen die niedrigste Aktivität des Steroidmetabolismus.

Sichtbare, jedoch statistisch nicht relevante Einflüsse durch Behandlung sind bei den 35 und 90 Tage alten Tieren zu vermerken. Bei der erstgenannten Altersstufe sinken die Mittelwerte der umgewandelten Substratanteile nach L- und S-Gabe ab, bei der letztgenannten steigen sie etwas an.

3.2.1.2. Metaboliten (Abb. 14 - 17)

DHT, DIOL und DELTA-4 sind die in nennenswerter Menge gefundenen Metaboliten des Testosteron.
DHT fällt mit 4 % der wiedergefundenen Gesamtradioaktivität bei den 20 Tage alten Tieren an. Die Altersstufe 35 Tage unterscheidet sich davon mit 3,7 % statistisch nicht. Ganz anders jedoch weist die Altersstufe 50 Tage mit 7,8 % den signifikant höchsten Wert auf. In der Altersstufe 90 Tage ist der Wert mit 1,4 % am geringsten, wie schon aus der niedrigen Gesamtumsatzrate dieser Altersstufe zu erwarten.
DIOL wird mit 5,5 % bei den 35 Tage alten Tieren signifikant höher vorgefunden als bei den anderen Altersstufen, die sich in der Bildung dieses Metaboliten nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Der niedrigste Wert findet sich wiederum in der Altersstufe 90 Tage mit 1 %, gefolgt von Altersstufe 20 mit 1,8 % und Altersstufe 50 mit 2,5 %. Behandlung mit L und S scheint bei den oben genannten 5-alpha-reduzierten Metaboliten im Falle der pubertären Tiere zu einem Absinken zu führen, was vermuten ließe, daß die Aktivität der entsprechenden Enzyme reduziert würde. Diese Effekte sind jedoch nicht statistisch belegbar.
DELTA-4 wird bei den unreifen Tieren in einem Prozentsatz von 2,2 % (20 Tage), 1,4 % (35 Tage) und 1,9 % (50 Tage) gewonnen. Ein Alterseffekt kann innerhalb dieser drei Altersstufen nicht nachgewiesen werden, entsteht jedoch durch L- und S-Behandlung, wodurch die Werte bei den juvenilen

Altersstufen ansteigen. Bei den 90 Tage alten Tieren liegt der DELTA-4-Nachweis unter 1 % und somit im Bereich des methodischen Fehlers.
Geringe Mengen der Metaboliten des 17-Keto-Weges, DION und Androsteron, können nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.
Werden die Prozentzahlen der 5-alpha-reduzierten Substanzen summiert, gewinnt man folgende Ergebnisse: Die höchsten Werte erreichen die pubertären Tiere um 10 % bzw. 11 % und zeigen damit einen hochsignifikanten Unterschied zu den beiden anderen Altersstufen. Die juvenilen Tiere setzen sich mit 6 % nochmals signifikant von den erwachsenen Tieren mit 3 % ab.
L- und S-Behandlung zeigt eine Tendenz zur Verringerung der Biokonversion in der pubertären Gruppe. Diese Verringerung ist bei SS-Behandlung nicht mehr zu erkennen. In der Erwachsenen-Gruppe tendieren die Werte in gegenteiliger Richtung, d.h. Anstieg nach L- und S-Gabe, Abfall nach SS-Gabe. Die Veränderungen durch Behandlung sind jedoch nicht signifikant.

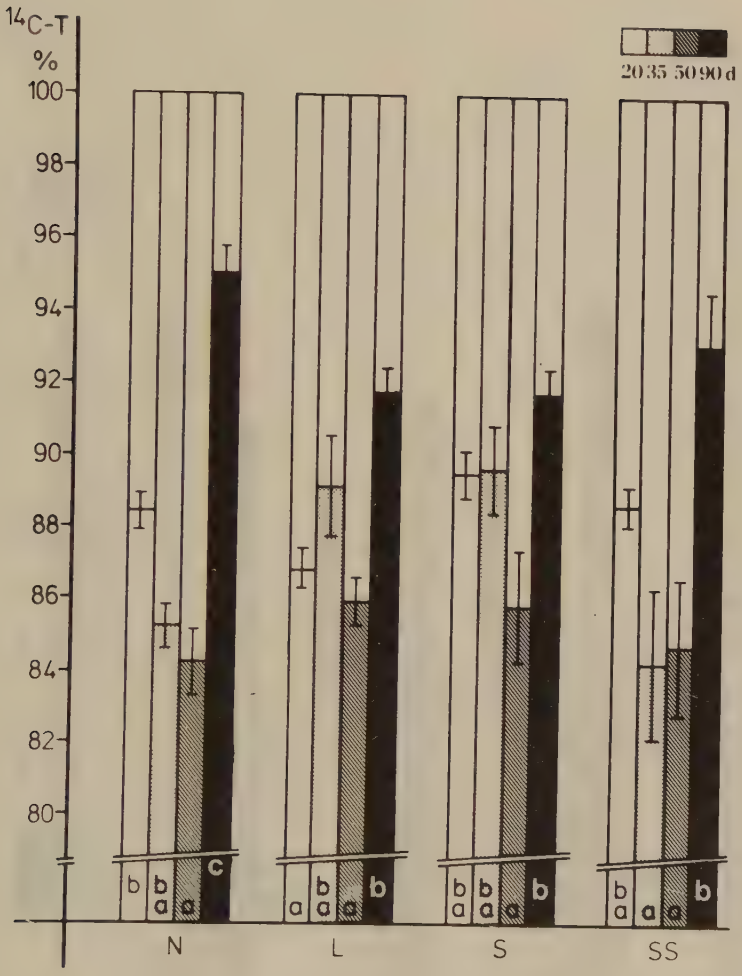


Abb. 13: Anteil des Substrats ^{14}C-Testosteron an der wiedergefundenen Radioaktivität in Prozent: Alterseffekte in den einzelnen Behandlungsreihen. Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Behandlungsgruppe hochsignifikant ($p < 0{,}001$). Die Leerräume oberhalb der Säulen stellen ein Maß für den Substratumsatz dar. Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

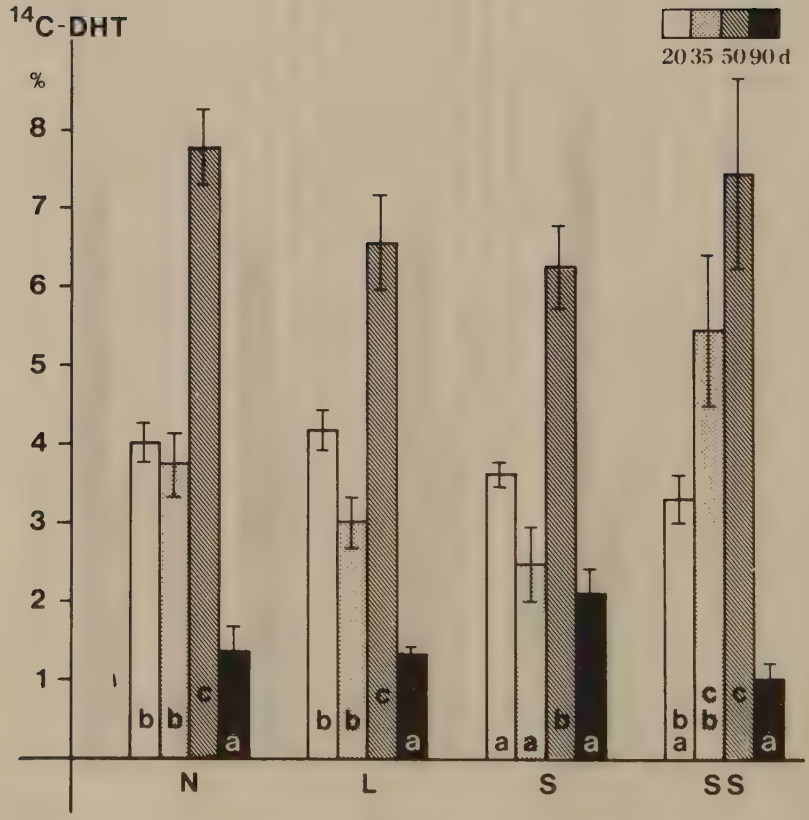


Abb. 14: ^{14}C-DHT als Metabolit von Testosteron, Anteil an der wiedergefundenen ^{14}C-Aktivität in Prozent: Alterseffekte in den einzelnen Behandlungsreihen. Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Behandlungsgruppe hochsignifikant ($p < 0{,}001$).
Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

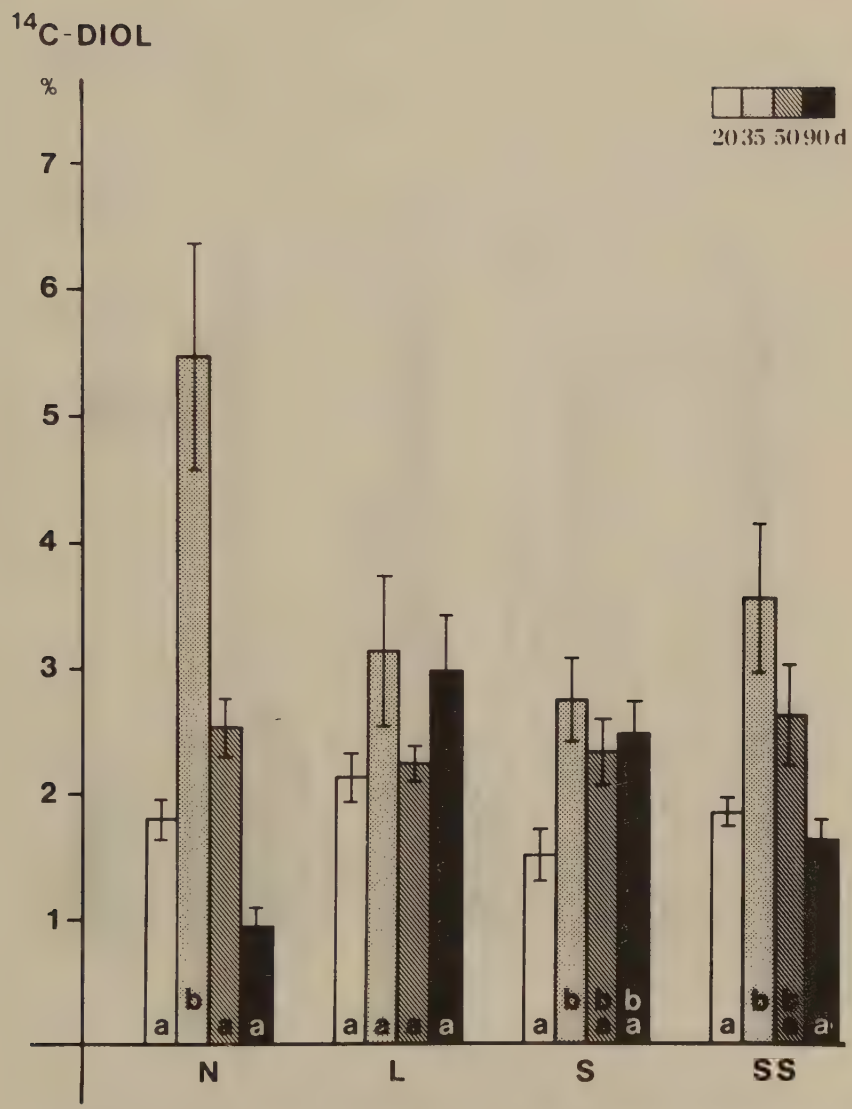


Abb. 15: ^{14}C-Androstandiol als Metabolit von Testosteron, Anteil an der wiedergefundenen ^{14}C-Aktivität in Prozent: Alterseffekte in den einzelnen Behandlungsreihen.
Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Behandlungsgruppe hochsignifikant ($p < 0{,}001$).
Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

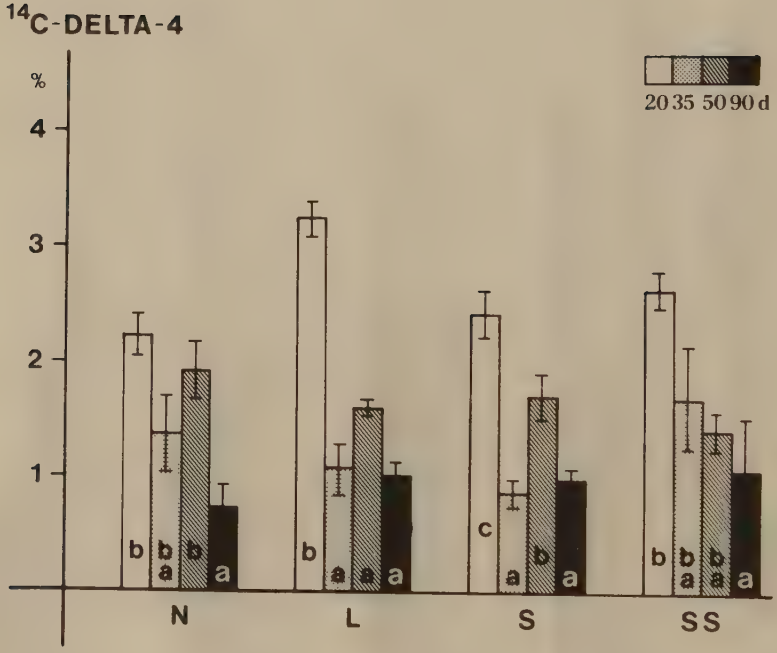


Abb. 16: ^{14}C-Androstendion als Metabolit von Testosteron, Anteil an der wiedergefundenen ^{14}C-Aktivität in Prozent: Alterseffekte in den einzelnen Behandlungsreihen.
Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Behandlungsgruppe hochsignifikant ($p < 0{,}001$).
Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

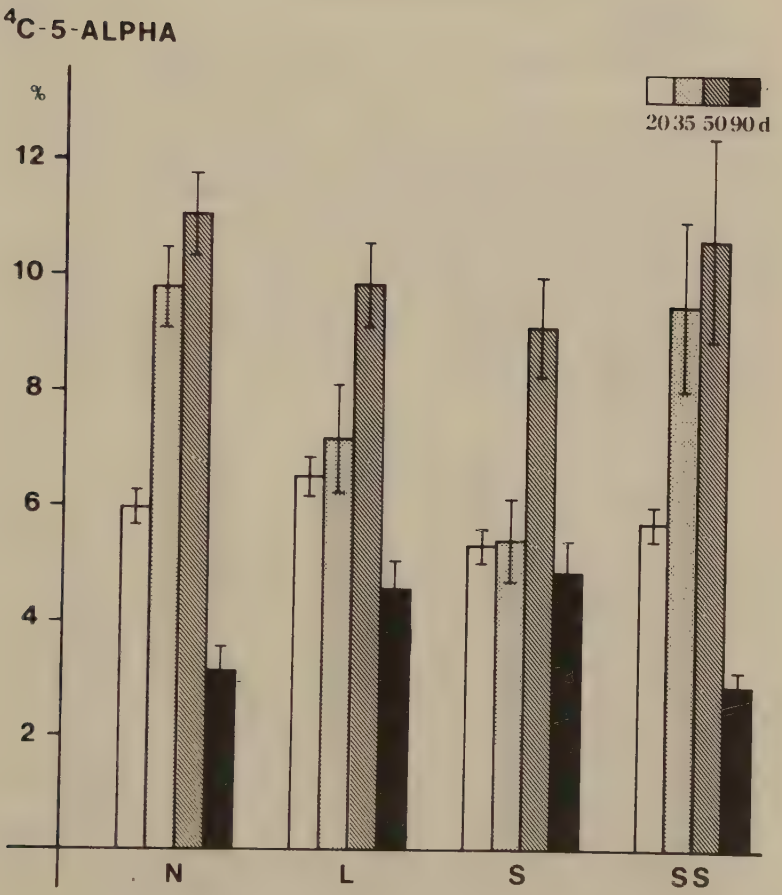


Abb. 17: Summe der ^{14}C-markierten 5-alpha-reduzierten Metaboliten von Testosteron, Anteil an der wiedergefundenen ^{14}C-Aktivität in Prozent: Alterseffekte in den einzelnen Behandlungsreihen. Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

3.2.2. Tritiummarkierte Substanzen

3.2.2.1. Substratumbau: Androstendion (Abb. 18)

Außer bei den 35 Tage alten Tieren werden hier insgesamt höhere Umsatzraten als bei Testosteron gefunden. Den höchsten Umsatz weisen die 20 und 50 Tage alten Tiere mit 18 % bzw. 20 % auf, die 35 Tage alten Tiere mit 15 % einen etwas geringeren. Den signifikant niedrigsten Umsatz zeigen wieder die erwachsenen Tiere mit 11 %.
Die größte Spanne zwischen den Altersstufen findet sich in der SS-Reihe, ohne daß sich das Verteilungsmuster wesentlich ändert.

3.2.2.2. Metaboliten (Abb. 19 - 21)

T, DION und Androsteron bilden die hauptsächlich anfallenden Metaboliten des Substrates DELTA-4.
DION fällt besonders in den pubertären Altersgruppen an und erreicht bei der 50 Tage alten Gruppe einen Wert von 5,7 %, bei der 35 Tage alten Gruppe einen Wert von 4,5 %. Die anderen beiden Altersstufen liegen im Bereich von 3 %.
Androsteron wird als Folgeprodukt in etwas geringerem Ausmaß gefunden. Die pubertären Tiere weisen eine 2-4fach höhere Androsteron-Bildungsrate auf als die anderen beiden Altersstufen. In der frühpubertären Gruppe werden Werte von knapp 3 % erreicht, während die Werte bei der spätpubertären Gruppe auf 2,1 % rückläufig sind. Bei den juvenilen Tieren wird Androsteron in einem Prozentsatz von unter 1 % gefunden.
Diese Altersgruppe ragt hingegen mit der Bildung von Testosteron heraus. Mit 6 % ist es der mit dem höchsten Anteil gebildete Metabolit in diesem Alter. Die Gruppe der 50 Tage alten Tiere steht dabei mit 5 % wenig nach. In den beiden anderen Altersstufen fällt T in einem Prozentsatz von etwa 3 % an.

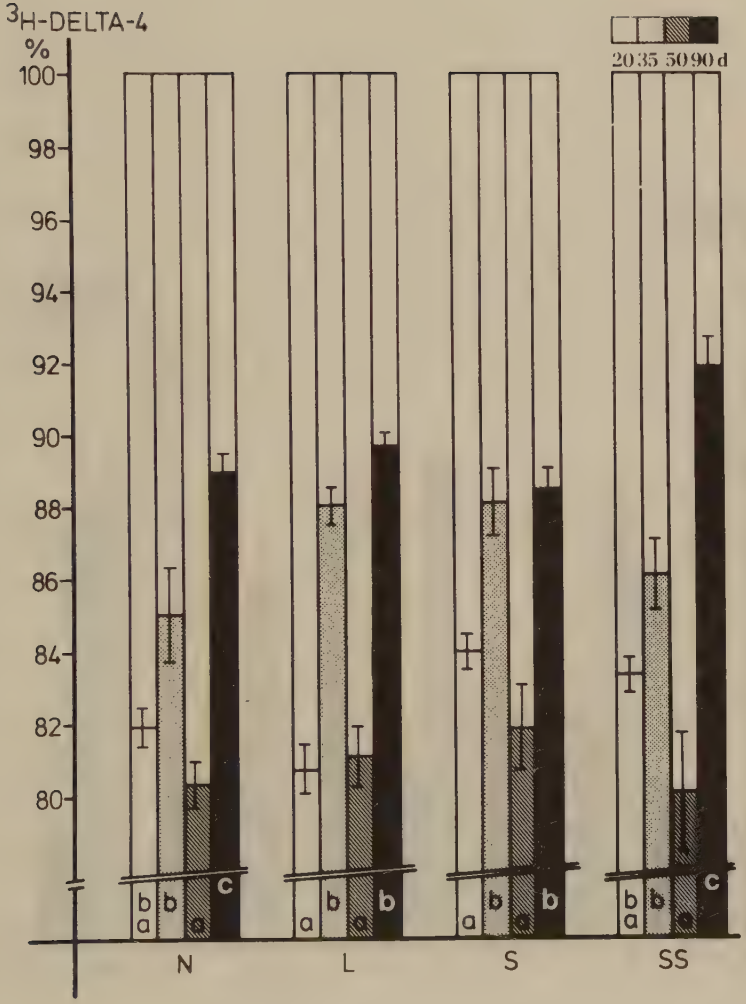


Abb. 18: Anteil des Substrats ^{3}H-Androstendion an der wiedergefundenen Radioaktivität in Prozent: Altersеffekte in den einzelnen Behandlungsreihen. Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Behandlungsgruppe hochsignifikant ($p < 0{,}001$). Die Leerräume oberhalb der Säulen stellen ein Maß für den Substratumsatz dar. Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

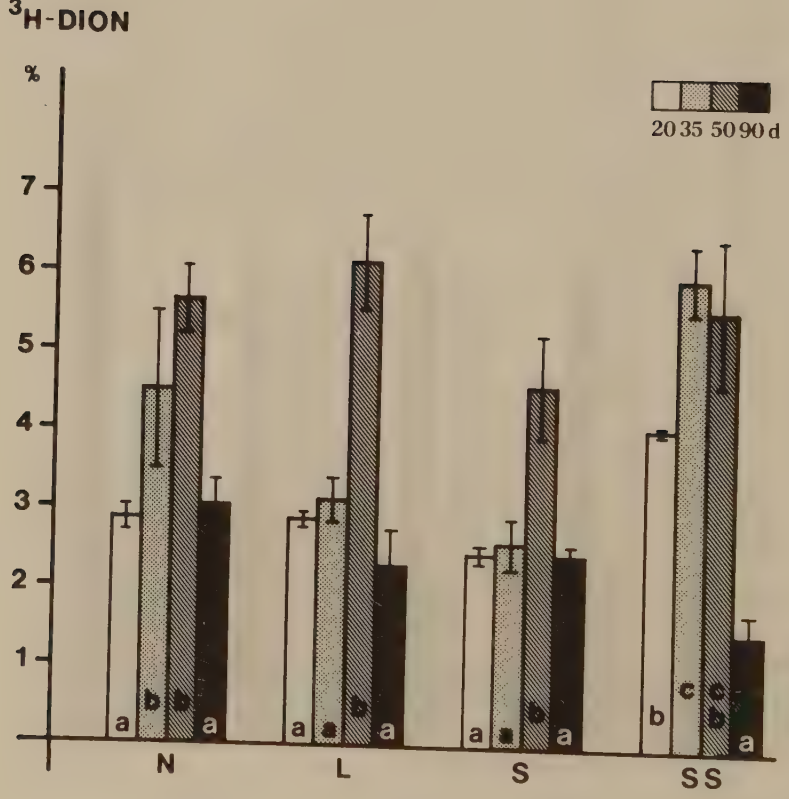


Abb. 19: ^{3}H-Androstandion als Metabolit von DELTA-4, Anteil an der wiedergefundenen ^{3}H-Aktivität in Prozent; Alterseffekte in den einzelnen Behandlungsreihen. Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Behandlungsgruppe hochsignifikant ($p < 0{,}001$).
Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

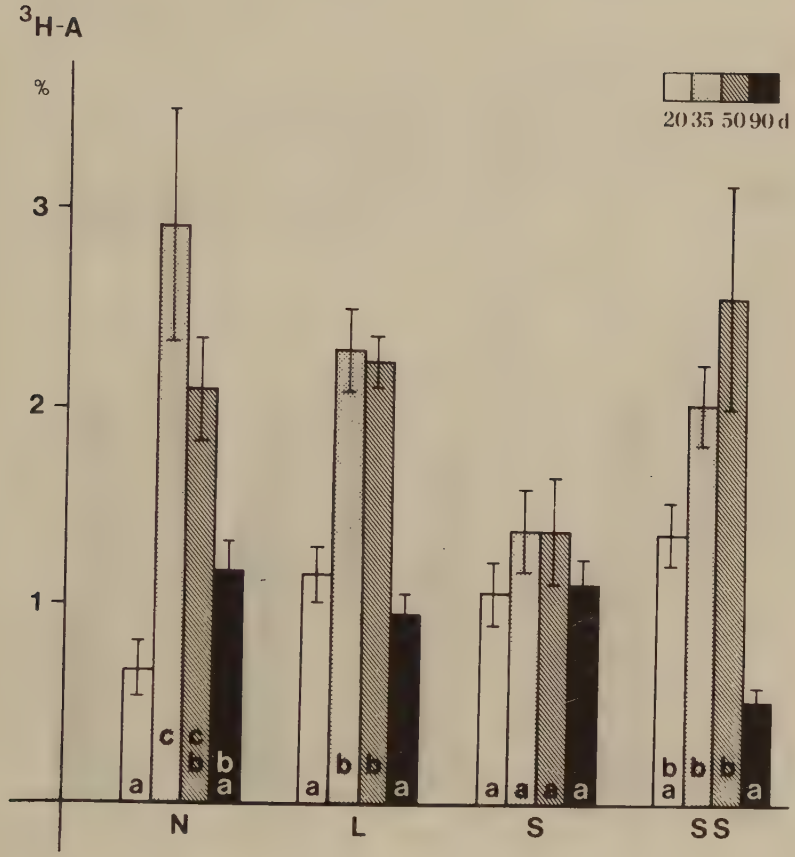


Abb. 20: ^{3}H-Androsteron als Metabolit von DELTA-4, Anteil an der wiedergefundenen ^{3}H-Aktivität in Prozent; Alterseffekte in den einzelnen Behandlungsreihen. Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Behandlungsgruppe hochsignifikant ($p < 0{,}001$).
Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

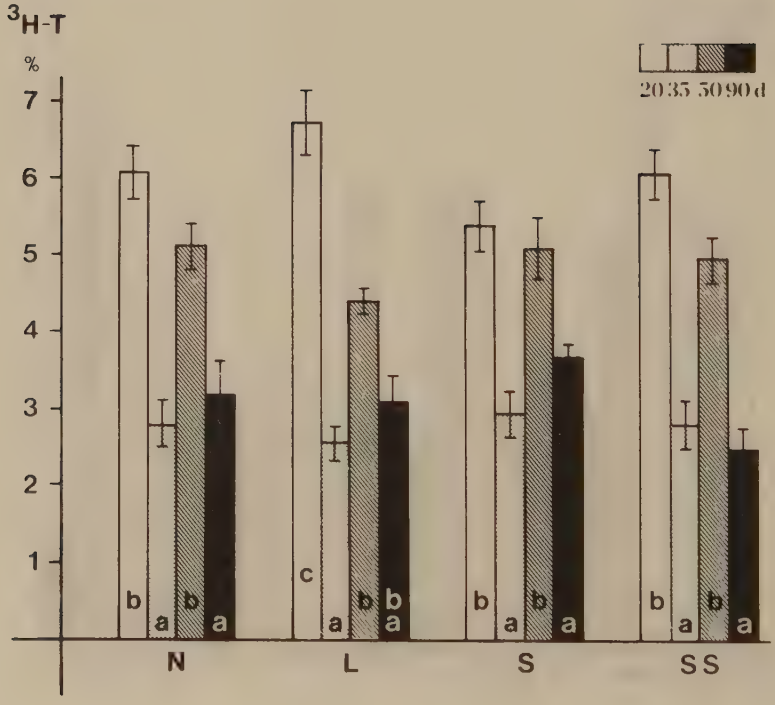


Abb. 21: ^{3}H-Testosteron als Metabolit von DELTA-4, Anteil an der wiedergefundenen ^{3}H-Aktivität in Prozent: Alterseffekte in den einzelnen Behandlungsreihen. Säulen mit ungleichen Lettern unterscheiden sich innerhalb einer Behandlungsgruppe hochsignifikant ($p < 0{,}001$).
Als Dispersionsmaß ist $s_{\bar{x}}$ angegeben.

DHT und DIOL als Metaboliten des 17-OH-Weges werden in deutlich geringerer Menge gefunden. Nennenswert ist allenfalls ein Gewinn von DHT von 1 % bis 1,5 % bei den spätpubertären bzw. den juvenilen Tieren. Die DIOL-Werte erreichen knapp 1 %.

Nach Summierung der 5-alpha-reduzierten Produkte ist ein deutlicher Alterseffekt sichtbar. Die pubertären Altersstufen weisen die höchste Rate an diesen Substanzen auf. Sie erreicht mit 9,8 % bei den 50 Tage alten Tieren knapp das Doppelte der erwachsenen Tiere.

3.2.3. Zusammenfassung

Bei den 20 Tage alten Tieren entfällt auf das aus Androstendion gebildete Testosteron der höchste Anteil mit 6 %. Dieser Wert ist signifikant höher als bei den frühpubertären und erwachsenen Tieren. DHT folgt an zweiter Stelle mit 4 % und ist signifikant höher im Vergleich zur adulten Altersstufe. In der Androstendion-Bildung aus Testosteron führt die juvenile Stufe mit 2,2 % widerum signifikant zur adulten Stufe.
Bei den 35 Tage alten Tieren ist DIOL mit 5,5 % der am stärksten anfallende Metabolit, zugleich signifikant höher als in den anderen 3 Altersstufen. Ebenso führt diese Altersstufe in der Bereitstellung von Androsteron (2,9 %) signifikant gegenüber den juvenilen und erwachsenen Tieren. DHT und DION liegen mit 3,7 % bzw. 4,5 % auf etwa gleicher Höhe.
Die 50 Tage alten Tiere zeigen den insgesamt höchsten Substratumsatz und weisen den höchsten DHT-Anteil von 7,8 % signifikant zu allen anderen Altersstufen auf. Ebenfalls ist die höchste DION-Bildung hier zu sehen, die nur bei der frühpubertären Stufe ähnlich hoch ist. Auch Testo-

steron erreicht hier mit 5,1 % wieder einen relativ hohen Wert, während DIOL und Androsteron im Vergleich zur frühen Pubertät abgesunken sind.
Bei den erwachsenen Tieren findet sich der geringste Substratumsatz. Nur DHT, DION und Androsteron erreichen prozentuale Anteile über 1 %, wobei DION mit 3 % den höchsten Wert erreicht.

Ein Gesamtüberblick ergibt sich, wenn die Ergebnisse im Hinblick auf die Stoffwechselwege und deren einzelne Stufen betrachtet werden. Daraus scheint hervorzugehen, daß das Substrat Testosteron bevorzugt zu Metaboliten des 17-OH-Weges umgewandelt wird, während das Substrat Androstendion vermehrt Metaboliten des 17-Keto-Weges hinterläßt.
Bei jedem der beiden Substrate sprechen die Ergebnisse für einen deutlichen Anstieg der 5-alpha-reduzierenden Aktivität in der Pubertät, wie aus Abb. 22 durch Summation der Werte beider Substrate hervorgeht. Die auf dem Stoffwechselweg als nächste Stufe folgende 3-alpha-Reduktion scheint ihren Aktivitätsgipfel in der Frühpubertät zu haben (Abb. 22).
Daneben liegen Hinweise für eine erhöhte Aktivität der 17-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase vor Beginn und gegen Ende der Pubertät vor, wobei die Richtung zum Testosteron als dem potenteren Androgen den Vorzug hat (Abb. 23).

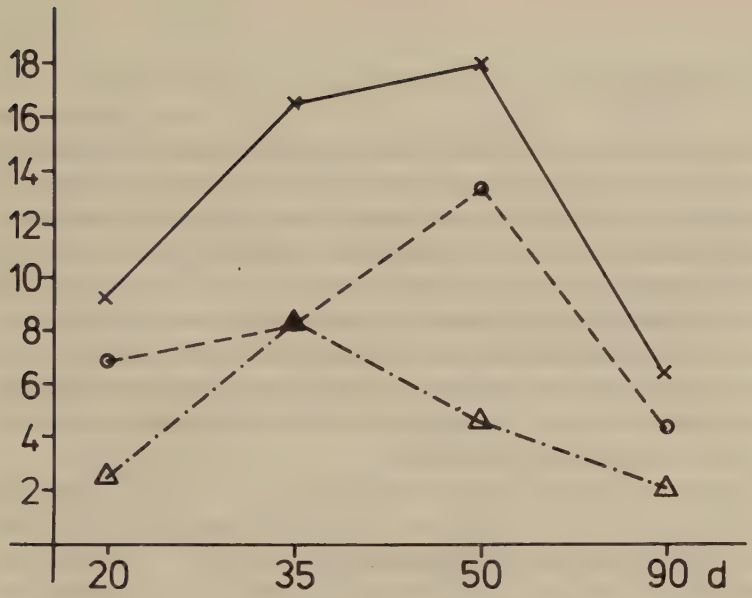


Abb. 22: 5-alpha- und 3-alpha-reduzierte Metaboliten:
Summe der Metaboliten aus beiden Substraten
——— ^{14}C-DHT + ^{14}C-DIOL + ^{3}H-DION + ^{3}H-A
– – – ^{14}C-DHT + ^{3}H-DION (nur 5-alpha-reduziert)
—·—·— ^{14}C-DIOL + ^{3}H-A (zusätzl. 3-alpha-reduziert)

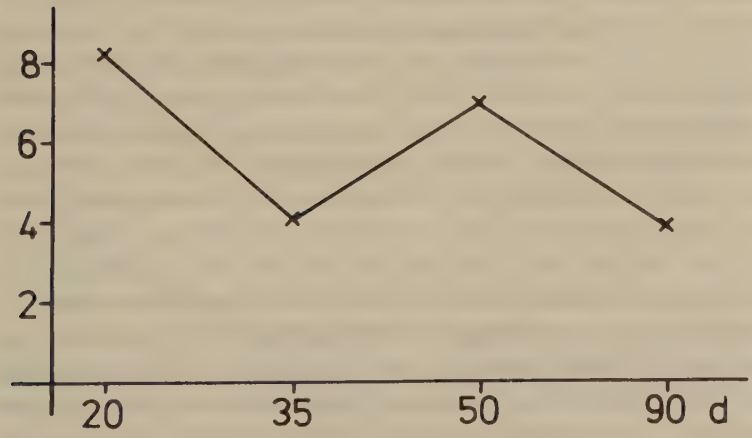


Abb. 23: Produkte der 17-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase:
Summe von ^{3}H-T (aus DELTA-4) und ^{14}C-DELTA-4 (aus T)

4. DISKUSSION

Die Abhängigkeit von steroidmetabolisierender Aktivitäten der Hypophyse vom Reifestadium sowie die Modifizierbarkeit dieser Aktivitäten innerhalb der Reifeperioden durch LHRH und das analoge Hormon D-Ala^{6}-DesGly^{10}-LHRH-EA war Gegenstand der vorliegenden Arbeit.
Nach Inkubation von Hypophysengewebe entsprechend vorbehandelter Ratten mit Testosteron und Androstendion wurde die prozentuale Verteilung von mehreren Metaboliten dieser Androgene bestimmt. Als Bezugsparameter wurden die Gonadotropin-Serumspiegel gemessen.

4.1. Gonadotropin-Serumspiegel

In der vorliegenden Arbeit steigen die LH-Serumspiegel kontinuierlich mit dem Alter an. Die FSH-Konzentrationen zeigen sehr niedrige Werte bei den juvenilen Tieren, einen scharfen Anstieg in der frühpubertären Phase und einen steten Abfall bis zum adulten Stadium.
Andere Autoren, die denselben Standard benutzen (NIAMD-rLH-RP1), messen LH-Konzentrationen zwischen 20 und 60 µg/l (Gupta et al. 1975 und 1977; Root und Russ 1972; Shapiro et al. 1976; Swerdloff et al. 1971). Die hier vorgelegten Werte lassen sich damit gut zur Deckung bringen. Der Altersverlauf findet sehr gute Parallelen bei Swerdloff et al. (1971), wie auch bei Gupta et al. (1975) und bei Root und Russ (1972).

Die FSH-Konzentrationen, wiederum die gleiche Referenzpräparation vorausgesetzt (NIAMD-rFSH-RP1), liegen in einzelnen Altersstufen in Bereichen wie bei Gupta et al. (1977, 1975, 1975b), Root und Russ (1972) und Debeljuk (1972). Bei Negro-Vilar et al. (1973) und Swerdloff et al.

(1971) werden Konzentrationen gefunden, die um das 2-4-fache höher sind.
Der Altersverlauf mit dem frühpubertären Gipfel wird ganz ähnlich von den beiden letztgenannten Autoren sowie von Debeljuk et al. (1972) beschrieben. Allein für den Wert der juvenilen Gruppe, der hier sehr niedrig ausfällt, fehlen jegliche Vergleichsmöglichkeiten. Vergleiche mit den anderen Altersstufen sowie mit den Werten nach Stimulation lassen diesen Wert als eher unwahrscheinlich erscheinen. Eine Erklärung für diesen Wert konnte nicht gefunden werden.

Stimulation mit den Releasing-Hormonen bewirkt eine zumeist signifikante Freisetzung von Gonadotropinen. Diese Freisetzung ist dosisabhängig in den Altersstufen 20, 35 und 50 Tage bei LH bzw. 20 und 35 Tage bei FSH. In der/den anderen Altersstufe(n) wird durch die hohe Dosierung des Analogen keine weitere Konzentrationserhöhung beobachtet. Besonders im Falle des LH scheint die Reaktion auf den Stimulus bei den drei jugendlichen Altersstufen empfindlicher zu sein. Ähnliche Beobachtungen werden von Swerdloff et al. (1971) berichtet. Bei juvenilen Ratten im Alter von 8 - 26 Tagen findet Miyachi (1973) keine Änderung der hypophysären Sensibilität auf LHRH.
Gonadotropinspiegel nach Stimulation mit D-Ala^{6}-DesGly^{10}-LHRH-ehtylamide werden in etwa vergleichbarer Weise bei Cusan et al. (1979) beschrieben. 60 min nach Gabe von 0,05 µg des Analogen werden etwa 230 µg/l bzw. 320 µg FSH/l gemessen. 60 min nach Gabe von 0,5 µg liegt die Serumkonzentration von LH bei 460 µg/l und von FSH bei 420 µg/l. Die Konzentrationen nach Applikation von nativem LHRH werden nach der gleichen Zeitspanne mit 100 µg LH/l und 370 µg FSH/l angegeben. Die Wirkungspotenz des Analogen beträgt hier also etwa das 4,6-fache für LH. FSH wird um 13 % mehr ausgeschüttet. Diese Werte wurden bei erwachsenen Tieren gewonnen.

4.2. Biokonversion

Unter den hier gewählten Bedingungen findet im Hypophysengewebe von Ratten eine Biokonversion der Substrate Testosteron und Androstendion in vitro statt. Ein weit überwiegender Prozentsatz der nicht als Substrat-Anteil wiedergefundenen Radioaktivität konnte in Form folgender Metaboliten identifiziert werden: DHT, Androstandiol, Androstandion, Androsteron und Androstendion bzw. Testosteron. Der Anteil nicht identifizierter Substanzen bewegte sich zwischen 1,6 bis 6,3 %. Ein Anteil von 84,3 bis 95,1 % des Testosteron bzw. von 80,3 bis 91,9 % des Androstendion an der wiedergefundenen Radioaktivität spricht für eine gute Substratsättigung der beteiligten Enzymsysteme.

Im Vergleich mit der Literatur seien zunächst die Untersuchungen von Klemm et al. (1975, 1976) sowie von Gupta et al. (1978) genannt. Die Versuchsbedingungen sind hier, was Cofaktoren, Inkubation, Extraktion und Trennung anbelangt, gleich, allerdings wird eine um 1/3 bzw. um 2/3 niedrigere Substratkonzentration verwendet. In diesen Arbeiten wurden im wesentlichen die drei Testosteronmetaboliten DHT, DIOL und DELTA-4 gefunden. Der Anteil des DIOL an den 5-alpha-reduzierten Substanzen beträgt 1/4 (Klemm et al. 1976), 1/3 (Gupta et al. 1976) bzw. 2/3 (Klemm et al. 1975). Das Verhältnis DHT: DIOL: DELTA-4 liegt bei allen Altersgruppen (16, 30, 50, 70 und 90 Tage) im Bereich von 10:6:3,5.
In der vorliegenden Arbeit beträgt der Anteil des DIOL an den 5-alpha-reduzierten Steroiden 1/3 bzw. 2/5 bei den juvenilen bzw. erwachsenen Tieren, 3/5 und 1/5 bei den früh- und spätpubertären Tieren. Das Verhältnis DHT: DIOL: DELTA-4 beträgt 10:5:6 (20 Tage), 10:3:2,5 (50 Tage), 10:7:6 (90 Tage) und läßt sich somit in diesen 3 Altersstufen mit den Verhältniswerten Klemms vergleichen. Dem-

gegenüber fällt die frühpubertäre Stufe heraus und weist mit einer Verhältniszahl von 10:15:4 auf eine erhöhte DIOL-Bildung hin.
Klemm beschreibt zwar eine deutliche Korrelation zwischen den Gonadotropin-Serumspiegeln und der hypophysären Bildung der 5-alpha-Metaboliten DHT und DIOL, er findet aber keinen Effekt der sexuellen Reifung auf den T-Metabolismus. Wie mehrfach bestätigt wurde, steigen die Gn-Serumspiegel während der Pubertät an (Gupta et al. 1975; Negro-Vilar et al. 1973; Root und Russ 1972; Swerdloff et al. 1971; Debeljuk et al. 1972). Die in der vorliegenden Studie gemessenen Gn-Serumspiegel bestätigen diesen Verlauf ebenfalls. Bei einer positiven Korrelation zwischen den Gonadotropinen und der 5-alpha-Reduktaseaktivität in der Hypophyse müßte doch dann ein Anstieg dieser Enzymaktivität in der Pubertät zu erwarten sein. Tatsächlich zeigen Denef et al. (1974) in einer Studie, die das ganze Altersspektrum von der Geburt bis zur Reife umfaßte, daß die hypophysäre 5-alpha-Reduktase-Aktivität, die postnatal erhöht ist, bis zum 10. Tag einen Gipfel erreicht, bis zum 25. Tag abfällt, um einen zweiten, größeren Gipfel zwischen dem 30. und 37. Tag zu erreichen und anschließend bis zum erwachsenen Stadium konstant abzufallen auf Werte, die unter denen der juvenilen Altersstufe liegen.
Ein derartiger Aktivitätsverlauf der 5-alpha-Reduktase in Abhängigkeit von der Reifeperiode kann in der vorliegenden Studie mit guter Übereinstimmung bestätigt werden, und dies sowohl für Testosteron als auch für Androstendion als Substrat (vgl. Abb. 22).
Massa et al. (1975) bestätigen den von Denef gefundenen Gipfel in der ersten Lebenswoche und beschreiben einen konstanten Aktivitätsabfall bis zum 35. Tag, untersuchen jedoch keine Tiere zwischen Tag 35 und 60.

Eine andere Untersuchergruppe (Genot et al. 1975) mißt die steroid-metabolisierenden Enzymaktivitäten verschiedener Gewebe bei Ratten im Alter von 3, 4, 6 und 9 Wochen und findet in der Hypophyse einen konstanten Abfall der DHT-Bildung von der 3. bis zur 9. Woche. Dagegen wird in den anderen Geweben (Prostata, Hypothalamus, Cortex cerebri) ein DHT-Gipfel in der 6. Woche gefunden! Besonders interessant erscheint hier der Gewinn von DIOL in Hypophyse, Hypothalamus und Prostata: In allen drei Geweben wird ein DIOL-Gipfel in der 6. Woche beschrieben, wobei in der Hypophyse der DIOL-Anteil den DHT-Anteil übersteigt. Dieser Ausdruck einer erhöhten Aktivität der 3-alpha-Dehydrogenase zeigt sich in der vorliegenden Arbeit in beiden pubertären Altersstufen (5. und 7. Woche) ganz besonders bei den 5 Wochen alten Tieren, und für beide Substrate (T DIOL und DELTA-4 A).
Man könnte nun vermuten, daß die verstärkte Bildung von DIOL während der Pubertät das Reglersystem Hypothalamus-Hypophyse mit Steroiden versorgt, die eine verstärkte Fähigkeit der LH-Inhibierung haben (Zanisi et al. 1973). Zusammenhänge könnten gesehen werden zu Befunden von Podestà und Rivarola (1974), Moger (1977) und Moger und Murphy (1977), die DIOL in bedeutender Menge im Serum von 20 bis 40 Tage alten Ratten gefunden haben, während die Spiegel von T und DHT in diesem Alter niedrig waren. Insgesamt geben diese Ergebnisse Hinweise auf eine erhöhte 3-alpha-reduzierende Aktivität während der frühen Pubertätsphase.

Über die Biokonversion des DELTA-4 ist in der Literatur sehr wenig zu finden. Nach Kenntnis des Verfassers haben sich im wesentlichen zwei Arbeitsgruppen mit der Transformation dieses Androgens durch neurale Gewebe befaßt: Die Gruppe um Naftolin erforschte die Möglichkeit der Aromatisierung von DELTA-4 zu Oestrogenen, wobei zwar der

Ring-A-Reduktion eine quantitativ bei weitem größere Bedeutung eingeräumt wird, jedoch auf die Ring-A-Aromatisierung mit Blick auf die qualitativ vielfach höhere Potenz der Oestrogene in den zentralendokrinen Wirkungen hingewiesen wird (Naftolin et al. 1972).
Die Gruppe um Pérez-Palacios (Pérez et al. 1975) untersuchte den Weg in die androgene Richtung (Ring-A-Reduktion). Da diese Experimente ohne Cofaktoren mit zerkleinertem Gewebe und vor allem mit wesentlich geringeren Substratkonzentrationen durchgeführt wurden, können nur vorsichtige Vergleiche gezogen werden. Einen relativ großen Anteil gewinnt auch hier die Testosteron-Bildung, im Vergleich zu einer weniger bedeutenden Menge an DHT. Hingegen kommt die direkte Reduktion des DELTA-4 zu 5-alpha-Androstandion stärker zum Ausdruck, wie auch in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde. Eine im Vergleich zum DHT überwiegende Androsteron-Bildung wird ebenfalls beschrieben. Diese Daten sprechen für eine Bevorzugung des 17-Keto-Weges bei der Biokonversion des DELTA-4, während anscheinend im Falle des T der 17-OH-Weg Schwerpunkte aufweist. Über die Altersabhängigkeit des DELTA-4-Metabolismus sind in der Literatur keine Angaben zu finden.

Die Behandlung der Tiere mit LHRH in einer Dosierung von 0,4 µg/100 g KG bzw. mit D-Ala^{6}-DesGly^{10} LHRH-ethylamide in einer Dosierung von 0,04 und 0,4 µg/100 KG zeigte bei einer Wirkungszeit von 30 min keine statistisch signifikanten Effekte.
Ähnliche Versuche mit solch kurzer Wirkungszeit des Releasing Hormones waren bisher noch nicht durchgeführt worden. Deshalb ist ein Vergleich mit Kastrationsversuchen notwendig. Kastration führt zu einer Erhöhung der Gondadotropin-Serumspiegel am 4. bis 7. Tag nach dem Eingriff (Gupta et al. 1975; Amatayakul et al. 1971; Root and Russ 1972). In neueren Arbeiten wurde ein signifikanter Anstieg schon

am ersten Tag nachgewiesen (Caraty et al. 1981). Kastration führt weiterhin zu einem Abfall des LHRH-Gehalts im Hypothalamus (Badger et al. 1978; Caraty et al. 1981) in Verbindung mit einem Konzentrationsanstieg von LHRH in den Portalgefäßen der Hypophyse und einer vermehrten Synthese durch den Hypothalamus (Eskay et al. 1977; Moguilevsky et al. 1974 u. 1975; Kochman et al. 1977). Kastration führt zu einer mehrfach bestätigten Aktivitätssteigerung der steroidmetabolisierenden Enzyme in der Hypophyse (Massa et al. 1972; Denef et al. 1973 u. 1974; Klemm et al. 1976; Gupta et al. 1978; Nguyen et al. 1974).
Der Effekt der Kastration auf diese Enzyme scheint jedoch um mindestens 3 Tage verzögert zu sein (Nguyen et al. 1974).
Ursache der Enzymaktivitätssteigerung könnten sowohl die Gondadotropine als auch LHRH direkt sein. Für letzteres sprechen die Ergebnisse von Has et al. (1975), die LHRH zu Hypophyseninkubat beigaben und daraufhin vermehrt 5-alpha-reduzierte Metaboliten aus dem Substrat Testosteron gewannen.
Auch für eine Wirkung der Gondadotropine liegen Hinweise vor: Korrelationen zwischen hypophysärem T-Metabolismus und den Gonadotropin-Serumspiegeln wurden nachgewiesen (Gupta et al. 1978; Klemm et al. 1976). Massa et al. (1972) inkubierten Hypophysen unter Zusatz verschiedener HVL-Hormone und fanden eine Zunahme des Androgenmetabolismus bei FSH (nicht bei LH). Nayfeh et al. (1975) berichteten von gonadotropher Regulation der 5-alpha-Reduktase-Aktivität im Rattenhoden: Hypophysektomie senkte die Aktivität, nachfolgende Behandlung mit FSH (auch mit LH) hob sie wieder an. In Übereinstimmung mit diesen Befunden wird in der vorliegenden Arbeit ein hoher Prozentsatz 5-alpha-reduzierter Metaboliten bei denjenigen Altersstufen beschrieben, die einen hohen FSH-Spiegel aufweisen.
In diesem Zusammenhang wird interessant, daß eine exogene wie endogene Steigerung der LHRH-Konzentration zu einer

Verminderung des hypophysären FSH-Gehalts führt (Gupta and Eichner 1977; Caraty et al. 1981) (Eine Verringerung des hypophysären Gn-Gehalts nach LHRH-Gabe wird allerdings von anderer Seite bestritten (Debeljuk et al. 1972)).

Eine Behandlung der Tiere mit LHRH oder einem seiner Analogen hätte also einen FSH-Mangel des in vitro untersuchten Hypophysengewebes zur Folge. Dieser FSH-Mangel könnte eine Ursache für das Ausbleiben von Behandlungseffekten in der hier beschriebenen Versuchsanordnung darstellen. Unterstützung bekommt diese Vermutung durch Befunde von Has et al. (1975), die die bereits zitierte, durch Beigabe von LHRH zum Hypophyseninkubat erzeugte Stimulation der Enzymaktivitäten nur bei Gewebe intakter Tiere finden, während sie bei Gewebe kastrierter Tiere (Kastration → Anstieg des LHRH → Entleerung des FSH-Pools?) von einer Inhibierung der Enzymaktivitäten berichten. Daraus erhebt sich die Frage nach einem notwendigen Synergismus von LHRH und FSH bei der Beeinflussung der Androgen-Biokonversion. Ein alleiniger, isolierter Einfluß von LHRH konnte jedenfalls bei einer Wirkzeit von 30 min nicht nachgewiesen werden.

4.3. Methodenkritik

Die bei der Biokonversionsstudie erreichte Substratsättigung spricht für die Wahl der richtigen Substratkonzentrationen im Inkubationsmedium. Diese Substratkonzentrationen erzwangen die Verwendung kleinerer Mengen Radioaktivität. Dadurch mußte eine größere Streuung bei den Werten derjenigen Substanzen, die in geringer Menge anfielen, in Kauf genommen werden. Die konstant einander entsprechenden Ergebnisse bei beiden Substraten weisen trotz allem auf die Zuverlässigkeit der Methode hin.

Die angewandte Methode läßt Aussagen über die prozentuale Verteilung der Metaboliten in Bezug auf die Gesamtradioaktivität zu. Genauere Analysenmethoden wie z. B. Rekristallisation bis zu konstanter spezifischer Aktivität erlauben dagegen quantitative Aussagen.
Die Verwendung zweier Substrate mit verschiedener radioaktiver Markierung hat den Vorteil, daß beide Substrate unter identischen Bedingungen verfolgt werden können. Es stellt sich andererseits aber die Frage nach der Bedeutung einer Interferenz, d.h. Konkurrenz um die Enzymsysteme oder aber nach der Veränderung der Enzymkinetik.
Das angewandte statistische Verfahren besticht durch seine Strenge, entbehrt jedoch auch nicht einer gewissen Rigidität, wenn z. B. ein LH-Anstieg um das Zwölffache bei mäßiger Streuung nicht als signifikant anerkannt wird. Dieser Nachteil wurde zugunsten einer kompromißlosen Auswertung akzeptiert.

4.4. Schlußfolgerung

Die Ergebnisse der Gondaotropine stimmen mit vorangehenden Arbeiten gut überein bis auf den zu niedrig ausfallenden FSH-Wert bei den juvenilen Tieren.
Die intraperitoneale Injektion von LHRH läßt die Gonadotropin-Serumspiegel deutlich und bis auf zwei Ausnahmen hochsignifikant ansteigen. Das superaktive analoge Hormon D-Ala^{6}-DesGly^{10}-LHRH-ethylamide stimuliert in 10-fach schwächerer Dosierung ähnliche Gonadotropin-Spiegel wie das Mutterhormon.
Aus den Ergebnissen der Hypophyseninkubation mit den Substraten Testosteron und Androstendion lassen sich Angaben über die prozentuale Verteilung der anfallenden Metaboliten machen. Zusammenhängende Alterseffekte lassen auf eine Modifikation der hypophysären Androgen-Biokonversion wäh-

rend der verschiedenen sexuellen Reifungsstadien schliessen. Ein Anstieg der 3-alpha-reduzierten Metaboliten geht mit einem FSH-Peak im frühen Pubertätsalter parallel. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen anderer Gewebe und des Serums. Der quantitativ bedeutsamere Anteil der 5-alpha-reduzierten Metaboliten hat dagegen in der Spätpubertät sein Maximum.
Die Tatsache, daß keine Behandlungseffekte auftreten, scheint einen kurzfristigen und alleinigen Einfluß von LHRH auf die Enzymaktivitäten auszuschließen. Eine Entleerung der FSH-Pools durch die LHRH-Stimulation könnte eine Ursache für ausbleibende Behandlungseffekte sein. Weitere Arbeiten müßten klären, ob die vermutete Wirkung des LHRH auf die Enzymaktivitäten durch FSH vermittelt wird. Weiterhin müßte die Latenz bis zum Wirkungseintritt und die Abhängigkeit von der gegebenen Dosis ermittelt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Hypophysen männlicher Ratten im Alter von 20, 35, 50 und 90 Tagen wurden mit ^{14}C-Testosteron und ^{3}H-Androstendion inkubiert.
Mittels Dünnschichtchromatographie und Flüssigkeits-Scintillationsmessung wurden Steroide des Hauptstoffwechselweges des Androgenmetabolismus isoliert und ihr prozentualer Anteil an der wiedergefundenen Radioaktivität berechnet. Durch Radioimmunoassay wurden aus dem Serum der Tiere die Gonadotropine als Bezugsparameter bestimmt. Die statistische Datenauswertung erfolgte in einer zweifaktoriellen Varianzanalyse.
Eine Biokonversionsrate zwischen 5 % und 20 % der wiedergefundenen Radioaktivität wurde ermittelt. Durchgängige Alterseffekte lassen auf eine Modifikation der hypophysären Androgen-Biokonversion während der verschiedenen sexuellen Reifestadien schließen. Auffallend ist ein Anstieg der 5-alpha-reduzierten Metaboliten DHT und Androstandion während der Pubertät, insbesondere während der Spätpubertät. Die aus den beiden vorgenannten durch 3-alpha-Reduktion hervorgehenden Metaboliten Androstandiol und Androsteron werden ebenfalls im Pubertätsalter vermehrt vorgefunden und zeigen einen Gipfel in der Frühpubertät parallel zu einem FSH-Gipfel. Weiterhin zeigt sich eine vermehrte Bildung von Testosteron aus Androstendion bzw. umgekehrt vor Beginn und gegen Ende der Pubertät.
Die intraperitoneale Injektion von LHRH bewirkte innerhalb von 30 min einen deutlichen und zumeist hochsignifikanten Anstieg der Serum-Gonadotropine. In den pubertären Altersstufen wurden nach Stimulation durch das Releasing Hormone die höchsten Serumspiegel beobachtet. Das superaktive analoge Hormon D-Ala^{6}-DesGly^{10}-LHRH-ethylamide stimulierte in 10-fach schwächerer Dosierung eine etwa gleiche Gonadotropin-Ausschüttung wie das Mutterhormon. Die Androgen-

Biokonversion wurde durch die Releasing Hormone nicht verändert. Ein kurzfristiger, isolierter Einfluß von LHRH auf hypophysäre Enzymaktivitäten konnte nicht nachgewiesen werden. Die ausbleibenden Behandlungseffekte könnten Folge einer Entleerung der FSH-Pools durch die LHRH-Stimulation sein und somit auf eine Mitwirkung des FSH bei der Modifikation der Androgen-Biokonversion hinweisen.

6. ABKÜRZUNGEN

A	Androsteron	3-alpha-Hydroxy-5-alpha-androstan-17-on
DELTA-4	Androstendion	Androst-4-en-3,17-dion
DHT	Dihydrotestosteron	17-beta-Hydroxy-5-alpha-androstan-3-on
DIOL	Androstandiol	5-alpha-Androstan-3-alpha-17-beta-diol
DION	Androstandion	5-alpha-Androstan-3,17-dion
T	Testosteron	17-beta-Hydroxy-androst-4-en-3-on

FSH (r-FSH)	Follikelstimulierendes Hormon (der Ratte)
LH (r-LH)	Luteinisierendes Hormon (der Ratte)
LHRH	Luteinisierendes Hormon - Releasing Hormone
LHRH-A	LHRH-Analogon, in der Aminosäuresequenz verändertes Releasing Hormone

G-6-P	Glucose-6-Phosphat
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
PBS	Phosphate buffered saline

DC	Dünnschichtchromatographie
RIA	Radioimmunoassay
S.A.	Spezifische Aktivität

7. TABELLENANHANG

Tab. 8: LH-Serumspiegel in µg/l bei verschiedenen Altersstufen und nach Behandlung mit LHRH(L) und seinem Analogen D-Ala^{6}-DesGly^{10}-LHRH-ethylamide in zwei Dosierungen (S und SS). N = Kontrollgruppe. Angegeben sind in jeder Zeile der Mittelwert $\bar{x}$ (oben) und die Standardabweichung s (rechts unten). In den Summenzeilen bzw. Summenspalten sind die Zeilenmittelwerte bzw. Spaltenmittelwerte und deren Differenz zum Gesamtmittelwert angegeben.

Beh. / Alter	N	L	S	SS	Zeilenmittel (ZM) Differenz ZM - GM
20 Tage	11,67 9,31	136,67 23,38	135,83 36,80	390,83 226,50	168,75 - 4,60
35	27,00 10,37	223,33 72,43	234,00 85,76	350,00 115,63	215,68 42,33
50	29,17 18,55	237,50 35,46	195,00 37,28	393,33 209,28	213,75 40,40
90	38,33 13,66	115,93 38,78	136,67 32,81	104,17 56,78	98,75 - 74,60
Spaltenmittel (SM)	26,52	178,33	172,83	309,58	173,35
Differenz SM - GM	-146,83	4,98	- 0,52	136,23	Gesamtmittelwert (GM

Tab. 9: FSH-Serumspiegel in µg/l bei verschiedenen Altersstufen und nach Behandlung mit LHRH(L) und seinem Analogen D-Ala^{6}-DesGly^{10}-LHRH-ethylamide in zwei Dosierungen (S und SS). N = Kontrollgruppe. Angegeben sind in jeder Zeile der Mittelwert $\bar{X}$ (oben) und die Standardabweichung s (rechts unten). In den Summenzeilen bzw. Summenspalten sind die Zeilenmittelwerte bzw. Spaltenmittelwerte und deren Differenz zum Gesamtmittelwert angegeben.

Beh. / Alter	N	L	S	SS	Zeilenmittel (ZM) Differenz ZM - GM
20 Tage	5,83	165,83	210,83	300,00	170,63
	4,92	40,42	96,30	35,07	-121,93
35	366,00	475,00	595,00	690,00	536,14
	67,12	59,41	190,23	123,69	243,58
50	223,33	363,33	335,00	319,17	310,21
	26,20	59,55	48,37	94,10	17,66
90	105,83	195,00	236,67	156,67	173,54
	33,83	36,47	36,70	48,74	-119,01
Spaltenmittel (SM)	166,96	299,79	333,48	366,46	292,55 (GM)
Differenz SM - GM	-125,60	+ 7,24	+40,93	+73,91	

Tab. 10: Ergebnisse der Biokonversion zweier Androgene durch Hypophysengewebe männlicher Ratten: Juvenile Alterstufe (20 Tage).
Angegeben sind die prozentualen Anteile an der wiedergefundenen Gesamtradioaktivität ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (s).

	N $\bar{x}$ s	L	S	SS	Substrat
T	88,43 1,26	86,83 1,51	89,52 1,56	88,66 1,33	
DHT	4,00 0,60	4,17 0,59	3,61 0,37	3,30 0,72	
DIOL	1,82 0,40	2,14 0,46	1,52 0,52	1,85 0,28	
DELTA-4	2,23 0,44	3,25 0,37	2,42 0,50	2,63 0,40	^{14}C-Testosteron
DION	0,40 0,10	0,37 0,07	0,33 0,06	0,29 0,07	
A	0,16 0,19	0,21 0,18	0,21 0,24	0,58 0,51	
Zone 0	2,68 0,22	2,89 0,56	2,25 0,44	2,54 0,35	
Zone e	0,27 0,08	0,15 0,04	0,15 0,07	0,14 0,07	
T	6,08 0,84	6,71 1,04	5,37 0,80	6,02 0,81	
DHT	1,53 0,35	1,23 0,40	0,73 0,17	0,57 0,25	
DIOL	0,74 0,14	0,96 0,21	0,75 0,16	0,74 0,10	
DELTA-4	81,93 1,34	80,75 1,63	84,01 1,20	83,36 1,17	
DION	2,86 0,42	2,87 0,27	2,44 0,33	5,93 0,15	^{3}H-Androstendion
A	0,67 0,34	1,16 0,34	1,07 0,39	1,38 0,39	
Zone 0	5,18 0,33	5,23 0,49	4,54 0,54	4,42 0,32	
Zone e	1,01 0,27	1,09 0,09	1,09 0,14	0,98 0,09	

Tab. 11: Ergebnisse der Biokonversion zweier Androgene durch Hypophysengewebe männlicher Ratten: Frühpubertäre Altersstufe (35 Tage). Angegeben sind die prozentualen Anteile an der wiedergefundenen Gesamtradioaktivität ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (s).

	N $\bar{x}$ s	L	S	SS	Substrat
T	85,26 1,33	89,16 3,40	89,66 2,75	84,28 5,12	
DHT	3,73 0,86	3,00 0,79	2,47 1,05	5,42 2,32	
DIOL	5,49 2,01	3,15 1,47	2,76 0,77	3,57 1,47	
DELTA-4	1,37 0,73	1,09 0,57	0,87 0,26	1,70 1,07	^{14}C-Testosteron
DION	0,38 0,23	0,34 0,13	0,29 0,06	0,45 0,33	
A	0,58 0,46	1,05 0,47	0,21 0,06	0,55 0,30	
Zone 0	2,75 0,60	2,02 0,63	3,60 1,13	3,83 1,02	
Zone e	0,28 0,09	0,19 0,12	0,13 0,05	0,17 0,07	
T	2,79 0,71	2,55 0,54	2,93 0,67	2,79 0,76	
DHT	0,59 0,20	0,43 0,10	0,77 0,37	1,09 0,71	
DIOL	0,63 0,27	0,45 0,16	0,48 0,05	0,48 0,12	
DELTA-4	85,05 2,88	88,05 1,27	88,14 2,04	86,14 2,42	
DION	4,51 2,24	3,12 0,70	2,58 0,71	4,04 1,08	^{3}H-Androstendion
A	2,92 1,32	2,30 0,51	1,39 0,47	2,04 0,49	
Zone 0	2,59 0,45	2,35 0,50	3,08 1,18	2,89 1,01	
Zone e	0,93 0,28	0,75 0,25	0,63 0,14	0,54 0,25	

Tab. 12: Ergebnisse der Biokonversion zweier Androgene durch Hypophysengewebe männlicher Ratten: Spätpubertäre Altersstufe (50 Tage). Angegeben sind die prozentualen Anteile an der wiedergefundenen Gesamtradioaktivität ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (s).

	N $\bar{x}$	s	L	S	SS	Substrat
T	84,25	2,24	85,97 1,66	85,84 3,78	84,75 4,58	
DHT	7,76	1,15	6,54 1,44	6,23 1,30	7,40 2,93	
DIOL	2,54	0,57	2,25 0,33	2,34 0,66	2,63 0,98	
DELTA-4	1,92	0,61	1,60 0,18	1,71 0,49	1,42 0,41	
DION	0,43	0,18	0,37 0,07	0,44 0,23	0,62 0,52	
A	0,77	0,75	1,08 0,94	0,61 0,93	0,69 0,76	^{14}C-Testosteron
Zone 0	2,11	0,68	2,05 0,56	2,57 1,19	2,24 0,56	
Zone e	0,24	0,06	0,14 0,07	0,26 0,08	0,25 0,12	
T	5,10	0,73	4,39 0,40	5,07 0,99	4,94 0,81	
DHT	1,06	0,36	0,83 0,38	1,40 0,87	0,88 0,19	
DIOL	0,74	0,12	0,80 0,22	0,88 0,19	0,86 0,12	
DELTA-4	80,32	1,56	81,10 2,03	81,89 2,91	80,11 4,00	
DION	5,65	1,09	6,13 1,46	4,57 1,60	5,54 2,26	^{3}H-Androstendion
A	2,09	0,65	2,24 0,32	1,39 0,66	2,59 1,40	
Zone 0	4,08	0,58	3,70 0,60	3,87 1,13	4,08 0,65	
Zone e	0,96	0,16	0,82 0,13	0,91 0,15	0,99 0,11	

Tab. 13: Ergebnisse der Biokonversion zweier Androgene durch Hypophysengewebe männlicher Ratten: Adulte Altersstufe (90 Tage).
Angegeben sind die prozentualen Anteile an der wiedergefundenen Gesamtradioaktivität ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (s).

	N $\bar{x}$ s	L	S	SS	Substrat
T	95,06 1,85	91,77 1,72	91,76 1,72	93,11 3,70	
DHT	1,37 0,81	1,34 0,20	2,12 0,73	1,04 0,45	
DIOL	0,96 0,38	2,99 1,08	2,48 0,67	1,64 0,40	
DELTA-4	0,75 0,48	1,02 0,29	0,99 0,25	1,07 1,13	
DION	0,15 0,12	0,31 0,34	0,29 0,21	0,24 0,26	^{14}C-Testosteron
A	0,14 0,11	0,23 0,10	0,27 0,20	0,21 0,31	
Zone 0	1,33 0,59	1,89 0,85	1,84 0,39	1,39 0,32	
Zone e	0,24 0,14	0,18 0,06	0,26 0,05	0,41 0,24	
T	3,17 1,08	3,07 0,86	3,65 0,42	2,47 0,64	
DHT	0,42 0,14	0,41 0,21	0,51 0,16	0,50 0,19	
DIOL	0,31 0,13	0,56 0,11	0,41 0,07	0,35 0,16	
DELTA-4	89,01 1,28	89,71 0,99	88,55 1,51	91,92 2,02	
DION	3,05 0,82	2,29 1,15	2,44 0,33	1,47 0,66	^{3}H-Androstendion
A	1,17 0,36	0,96 0,25	1,11 0,32	0,53 0,17	
Zone 0	1,83 0,37	2,62 0,57	2,44 0,64	1,71 0,34	
Zone e	1,03 0,28	0,39 0,09	1,34 1,09	1,05 0,18	

8. LITERATURVERZEICHNIS

Amatayakul K, Ryan R, Uozumi T, Albert A (1971)
A reinvestigation of testicular-anterior pituitary relationships in the rat: I. Effects of castration and cryptorchidism
Endocrinology 88, 872 - 880

Arimura A, Saito M, Yaoi Y, Kumasaka T, Sato H, Koyama T, Nishi N, Kastin A J, Schally A V (1973)
Comparison of the effects of subcutaneous and intravenous injection of synthetic LH-releasing hormone (LH-RH) on serum LH and FSH levels in men
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 385 - 388

Badger T M, Wilcox C E, Meyer E R, Bell R D, Cicero T J (1978)
Simultaneous changes in tissue and serum levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone/follicle-stimulation hormone releasing factor after castration in the male rat
Endocrinology 102, 136 - 141

Beyer C, Jaffe R B, Gay V L (1972)
Testosterone metabolism in target tissues: Effects of testosterone and dihydrotestosterone injection and hypothalamic implantation on serum LH in ovariectomized rats
Endocrinology 91, 1372 - 1375

Braun A J
Der Einfluß von LH-RH und einem seiner superaktiven Analoga auf den Serumgonadotropinspiegel und auf den Androgen-Metabolismus im Hoden männlicher Ratten in verschiedenen Stadien der sexuellen Reife
Med. Dissertation (in Vorbereitung), Universität Tübingen

Bruchovsky N, Wilson J D (1968)
The conversion of testosterone to 5-alpha-androstan-17-beta-ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro
J. Biol. Chem. 243, 2012 - 2021

Caraty A, de Reviers M M, Martinat N, Blanc M R (1981)
A reinvestigation of hypothalamic-pituitary testicular interactions: simultaneous changes on tissue and plasma levels of gonadotrophins, prolactin, testosterone and hypothalamic LH-RH after bilateral orchidectomy and cryptorchidism
Reprod. Nutr. Dévelop. 21, 455 - 465

Coy D H, Coy E J, Schally A V, Vilchez-Martinez J, Hirotsu Y, Arimura A (1974)
Synthesis and biological properties of (D-ALA-6,DES-GLY-NH_2-10)-LH-RH ethylamide, a peptide with greatly enhanced $LH^{=}$ and FSH-releasing activity
Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 335 - 340

Coy D H, Vilchez-Martinez J A, Coy E J, Nishi N, Arimura A, Schally A V (1975)
Polyfluoralkylamine derivatives of luteinizing hormone-releasing hormone
Biochem. 14, 1848 - 1851

Critchlow V, Bar-Sela M E (1967)
Control of the onset of puberty
Neuroendocrinology 2, 101 - 162

Cusan L, Auclair C, Belanger A, Ferland L, Kelly P A, Seguin C, Labrie F (1979)
Inhibitory effects of long term treatment with a LH-RH agonist on the pituitary-gonadal axis in male and female rats
Endocrinology 104, 1369 - 1376

Debeljuk L, Arimura A, Schally A V (1972)
Studies on the pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in intact male rats of different ages
Endocrinology 90, 585 - 588

Denef C, Magnus C, McEwen B S (1973)
Sex differences and hormonal control of testosterone metabolism in rat pituitary and brain
J. Endocr. 59, 605 - 621

Denef C, Magnus C, McEwen B S (1974)
Sex-dependent changes in pituitary 5-alpha-dihydrotestosterone and 3-alpha-androstanediol formation during postnatal development and puberty in the rat
Endocrinology 94, 1265 - 1274

Eckert H G (1976)
Die Technik des Radioimmunoassays
Angew. Chem. 17, 565 - 574

Eskay R L, Mical R S, Porter J C (1977)
Relationship between luteinizing hormone concentration in hypophysial portal blood and luteinizing hormone release in intact, castrated and electrically-stimulated rats
Endocrinology 100, 263 - 270

Frederiksen D W, Wilson J D (1971)
Partial characterization of the nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: ^{4}-3-ketosteroid 5alpha-oxidoreductase of rat prostate
J. Biol. Chem. 246, 2584 - 2593

Fujino M, Kobayashi S, Obayashi M, Shinagawa S, Fukuda T, Kitada C, Nakayama R, Yamazaki I, White W F, Rippel R H (1972)
Structure-activity relationships in the c-terminal part of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 863 - 869

Genot A, Loras B, Monbon M, Bertrand J (1975)
In vitro metabolism of testosterone in the rat brain during sexual maturation-III: Studies of the formation of main androstane-diols and androstene-diols
J. Steroid Biochem. 6, 1247 - 1252

Greene E C (1968)
Anatomie of the rat
Hafner Publishing Company, New York and London

Greenwood F C, Hunter W M, Glover J S (1963)
The preparation of 131 I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity
Biochem. J. 89, 114 - 123

Griffiths E C, Hopkinson C R N (1979)
Inactivation of two hyperactive LH-RH analogues by rat hypothalamic peptidases
Hormone Res. 10, 233 - 242

Gupta D (1974)
Gonadal steroids and gonadotrophin feedback regulation of mammalian sexual maturation
In: Crossignani P G, James V H T (Eds.):
Recent progress in reproductive endocrinology;
Academic Press, London

Gupta D (1974a)
Inhärente Tendenz zur Weiblichkeit. Hormone und die Kontrolle der männlichen Sexualfunktion.
Sexualmedizin 3, 68 - 74

Gupta D (1977)
Hypothalamic control of the mammalian sexual maturation
Pädiatrie und Pädologie. Pädiatrie Suppl. 5, 0/10, 53 - 60

Gupta D (1977a)
Androgens and antiandrogens in relation to human sexual maturity, 295 - 308
In: Martini L, Motta M (Eds.):
Androgens and antiandrogens; Raven Press, New York

Gupta D, Eichner M (1978)
An appraisal of the male hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis in the rat during sexual maturation, 257 - 285
In: Gupta D and Voelter W (Eds.):
Hypothalamic hormones - chemistry, physiology, and clinical applications; Chemie Verlag, Weinheim, New York

Gupta D, Eichner M (1977)
Age related changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone in the male rat
Res. exp. Med. 170, 289 - 293

Gupta D, Klemm W, Eichner M (1978)
Augmentation of in vitro pituitary biotransformation of testosterone due to orchidectomy and its relation to serum gonadotropins in the rat
Res. exp. Med. 172, 239 - 246

Gupta D, Rager K, Zarzycki J, Eichner M (1975)
Levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and dihydrotestosterone in the circulation of sexually maturing intact male rats and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism
J. Endocr. 66, 183 - 193

Gupta D, Rager K, Attanasio A, Klemm W, Eichner M (1975a)
Sex steroid hormones during multiphase pubertal developments
J. Steroid Biochem. 6, 859 - 868

Gupta D, Rager K, Eichner M, Zech K, Fuchs S, Voelter W (1975b)
Pituitary gonadotrophins and androgen release induced by a synthetic tetrapeptide in male prepubertal and adult rats
J. Endocr. 64, 391 - 392

Has B, Kniewald Z, Milković S (1975)
Effects of coincubation of the pituitary and hypothalamus of intact and castrate male rats and the influence of LH-RH on pituitary 5-alpha-reductase activity
Neuroendocrinology 19, 36 - 43

Inano H, Tamaoki B (1974)
Purification and properties of NADP-dependent 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase solubilized from porcine testicular microsomal fraction
Eur. J. Biochem. 44, 13 - 23

Jaffe R B (1969)
Testosterone metabolism in target tissues: Hypothalamic and pituitary tissues of the adult rat and human fetus, and the immature rat epiphysis (1)
Steroids 14, 483 - 498

Jetter E (1976)
Gonadotropinbestimmung im Plasma nach LH-RH-Stimulation vor und nach der Pubertät
Med. Dissertation, Universität Tübingen

Jung S (1958)
Zucht und Haltung der wichtigsten Laboratoriumversuchstiere.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

Kastin A J, Schally A V, Gual C, Arimura A (1972)
Release of LH and FSH after administration of synthetic LH-releasing hormone
J. Clin. Endocr. 34, 753 - 756

Kelch R P, Clemens L E, Markovs M, Westhoff M H, Hawkins D W (1975)
Metabolism and effects of synthetic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in children and adults
J. Clin. Endocrinol. Metab. 40, 53 - 61

Kingsley T R, Bogdanove E M (1973)
Direct feedback of androgens: Localized effects of intrapituitary implants of androgens on gonadotrophic cells and hormone stores
Endocrinology 93, 1398 - 1409

Klemm W, Gupta D (1975)
Pituitary biotransformation of testosterone to its 5-alpha-reduced metabolites in sexually maturing male rats and after orchidectomy and experimental bilateral cryptorchidism
J. Endocrinol. 65, 12P

Klemm W, Eichner M, Gupta D (1976)
Relation between rat pituitary metabolism of testosterone and plasma LH and FSH, 141 - 146
In: Antikatzides Th, Erichsen S, Spiegel A (Eds.):
The laboratory animal in the study of reproduction.
6 th ICLA Symposium Thessaloniki 1975;
Gustav Fischer, Stuttgart, New York

Kochman K, Kochman H, Domanski E (1977)
Biosynthesis of the luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in the rat hypothalamus
Acta physiol. 28, 353 - 358

Liu S C, Jackson G L (1978)
Modifications of luteinizing hormone biosynthesis and release by gonadotropin-releasing hormone, cycloheximide, and actinomycin D
Endocrinology 103, 1253 - 1262

Mangold H K (1967)
Isotopentechnik, 155 - 179
In: Stahl E (Hrsg.): Dünnschichtchromatographie;
2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Martini L (1982)
The 5-alpha-reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications
Endocrine Reviews 3, 1 - 25

Massa R, Justo S, Martini L (1975)
Conversion of testosterone into 5-alpha-reduced metabolism in the anterior pituitary and in the brain of maturing rats
J. Steroid Biochem. 6, 567 - 571

Massa R, Stupnicka E, Kniewald Z, Martini L (1972)
The transformation of testosterone into dihydrotestosterone by the brain and the anterior pituitary
J. Steroid Biochem. 3, 385 - 399

Miyachi Y, Nieschlag E, Lipsett M B (1973)
The secretion of gonadotropins and testosterone by the neonatal male rat
Endocrinology 92, 1 - 5

Moger W H (1977)
Serum alpha-androstane-3-alpha,17-beta-diol, androsterone, and testosterone concentrations in the male rat: Influence of age and gonadotropin stimulation
Endocrinology 100, 1027 - 1032

Moger W H, Murphy P R (1977)
Serum 5-alpha-androstane-3-alpha,17-beta-diol, androsterone and testosterone concentrations in the immature male rat: Influence of time of day
J. Endocrinol. 75, 177 - 178

Moguilevsky J A, Enero M A, Szwarcfarb B (1974)
Luteinizing hormone releasing hormone-biosynthesis by rat hypothalamus in vitro. Influence of castration
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 147, 434 - 437

Moguilevsky J A, Scacchi P, Debeljuk L, Faigon M R (1975)
Effect of castration upon hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LH-RF)
Neuroendocrinology 17, 189 - 192

Monahan M W, Amoss M S, Anderson H A, Vale W (1973)
Synthetic analogs of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor with increased agonist or antagonist properties
Biochem. 12, 4616 - 4620

Monroe S E, Parlow A F, Midgley Jr A R (1968)
Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone
Endocrinology 83, 1004 - 1012

Naftolin F, Ryan K J (1975)
The metabolism of androgens in central neuroendocrine tissues
J. Steroid Biochem. 6, 993 - 997

Naftolin F, Ryan K J, Petro Z (1972)
Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats
Endocrinology 90, 295 - 298

Nair R M G, Sagel J, Colwell J A, Mathur R S, Powers J M, Luborsky-Moore J , Worthington Jr W C (1978)
Modern concepts on the structure-activity relationship and the mechanism of action of gonadotropin-releasing hormone and its superactive analogues, 21 - 45
In: Gupta D, Voelter W (Eds.):
Hypothalamic hormones - chemistry, physiology, and clinical applications;
Verlag Chemie , Weinheim, New York

Nayfeh S N, Coffey J C, Kotite N J, French F S (1975)
Gonadotropic regulation of 5-alpha-reductase activity in the interstitial cells and whole testis homogenate of the immature rat
Curr. Top. Mol. Endocrin. 2, 53 - 64

Negro-Vilar A, Krulich L, McCann S M (1973)
Changes in serum prolactin and gonadotropins during sexual development of the male rat
Endocrinology 93, 660 - 664

Neher R (1967)
DC von Steroiden und verwandten Verbindungen, 302 - 345
In: Stahl E (Hrsg.):
Dünnschichtchromatographie;
2. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Nguyen C T, Duval J, Samperez S, Jouan P (1974)
Testosterone 5-alpha-reductase of microsomes from rat anterior hypophysis: properties, increase by castration, and hormonal control
Biochimie 56, 899 - 906

Odell W D, Swerdloff R S, Jacobs H S, Hescox M A (1973)
FSH induction of sensitivity to LH: one cause of sexual maturation in the male rat
Endocrinology 92, 160 - 168

Pérez A E, Ortiz A, Cabeza M, Beyer C, Pérez-Palacios G (1975)
In vitro metabolism of ^{3}H-androstenedione by the male rat pituitary, hypothalamus, and hippocampus
Steroids 25, 53 - 62

Podestå E J, Rivarola M A (1974)
Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rats at different stages of development
Endocrinology 95, 455 - 461

Ramirez V D, McCann S M (1965)
Inhibition effect of testosterone on luteinizing hormone secretion in immature and adult rats
Endocrinology 76, 412 - 417

Reeves J J, Tarnavsky G K, Becker S R, Coy D, Schally A V (1977)
Uptake of iodinated luteinizing hormone releasing hormone analogs in the pituitary
Endocrinology 101, 540 - 547

Resko J A, Feder H H, Goy R W (1968)
Androgen concentrations in plasma and testis of developing rats
J. Endocr. 40, 485 - 491

Rommerts F F G, van der Molen H J (1971)
Occurrence and localization of 5-alpha-steroid reductase, 3-alpha- and 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenases in hypothalamus and other brain tissues of the male rat
Biochim. biophys. Acta 248, 489 - 502

Root A W, Russ R D (1972)
Short-term effects of castration and starvation upon pituitary and serum levels of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in male rats
Acta Endocrinol. 70, 665 - 675

Samperez S, Thieulant M - L, Jouan P (1971)
Recherches complémentaires sur les modalités de la pénétration in vitro de la testostérone-^{3}H dans l'hypophyse antérieure, l'hypothalamus et le cortex cérébral du rat normal et castré
Annls. Endocr. 32, 31 - 42

Schally A V, Coy D H, Arimura A, Vilchez J, Redding T W, Kastin A J (1978)
Survey of the structure, synthesis and biological activity of hypothalamic releasing and inhibiting hormones, 3-7
In: Gupta D, Voelter W (Eds.): Hypothalamic hormones - chemistry, physiology, and clinical applications;
Verlag Chemie, Weinheim, New York

Schally A V, Arimura A, Baba Y, Nair R M G, Matsuo H, Redding T W, Debeljuk L (1971)
Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 393 - 399

Schally A V, Arimura A, Kastin A J, Matsuo H, Baba Y, Redding T W, Nair R M G, Debeljuk L, White W F (1971a)
Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulation hormones
Science 173, 1036 - 1038

Scriba P C, von Werder K (1982)
Hypothalamus und Hypophyse, 294 - 329
In: Siegenthaler W (Hrsg.): Klinische Pathophysiologie;
Georg Thieme, Stuttgart, New York

Shanies D D, Hirschhorn K, New M I (1972)
Metabolism of testosterone-^{14}C by cultured human cells
J. Clin. Invest. 51, 1459 - 1468

Shapiro M I, Collu R, Massé D, Ducharme J R, Roux J F (1976)
The influence of varying illumination on steroid 5-alpha-reductase activity and gonadotropin levels in the rat
Life Sciences 19, 1341 - 1346

Sholiton L J, Jones C E, Werk E E (1972)
The uptake and metabolism of (1,2-^{3}H)-testosterone by the brain of functionally hepatectomized and totally eviscerated male rats
Steroids 20, 399 - 415

Sholl S A, Robinson J A, Goy R W (1975)
Neural uptake and metabolism of testosterone and dihydrotestosterone in the guinea pig
Steroids 25, 203 - 215

Smith E R, Davidson J M (1967)
Differential responses to hypothalamic testosterone in relation to male puberty
Am. J. Psych. 212, 1385 - 1390

Steinberger E, Ficher M (1971)
Formation and metabolism of testosterone in testicular tissue of immature rats
Endocrinology 89, 679 - 684

Swerdloff R S, Walsh P C, Jacobs H S, Odell W D (1971)
Serum LH and FSH during sexual maturation in the male rat: effect of castration and cryptorchidism
Endocrinology 88, 120 - 128

Swift A D, Crighton D B (1979)
Relative activity, plasma elimination and tissue degradation of synthetic luteinizing hormone releasing hormone and certain of its analogues
J. Endocr. 80, 141 - 152

Vale W, Rivier C, Brown M, Leppaluoto J, Ling N, Monahan M, Rivier J (1976)
Pharmacology of hypothalamic regulatory peptides
Clinical Endocrinology 5, Suppl., 261s-273s

Wittkowski W (1971)
Drüsenzelltypen und Hormonlokalisation im Hypophysenvorderlappen
Dtsch. Med. Wochenschr. 96, 1225 - 1228

Yamamoto M, Diebel N D, Bogdanove E M (1970)
Analysis of initial and delayed effects of orchidectomy and ovariectomy on pituitary and serum LH levels in adult and immature rats
Endocrinology 86, 1102 - 1111

Yen S S C , Rebar R, VandenBerg G, Naftolin F, Ehara Y, Engblom S, Ryan K J, Benirschke K (1972)
Synthetic luteinizing hormone-releasing factor: A potent stimulator of gonadotropin release in man
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 1108 - 1111

Zanisi M, Motta M, Martini L (1973)
Inhibitory effect of 5-alpha-reduced metabolites of testosterone on gonadotrophin secretion
J. Endocr. 56, 315 - 316

Zeman W, Innes J R M (Eds.) (1963)
Craigie's neuroanatomy of the rat
Academic Press, New York, London

Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Gupta, Direktor der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik von Hormon- und Stoffwechselstörungen an der Universitätskinderklinik Tübingen, danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Dipl. Biochem. Dr. med. B. Blank danke ich für die statistische Auswertung der Ergebnisse, Herrn Dipl. Biochem. Dr. med. W. Blum für die Unterstützung bei der Durchführung des Radioimmunoassays. Beiden Kollegen sei auch für die freundliche Beratung bei methodischen Fragen gedankt.

Den Assistentinnen des Hormonlabors, insbesondere Frau I. Balke und Frau G. Munding, danke ich für labortechnische Hinweise.
Dank gebührt auch dem Leiter der Werkstatt, Herrn Reutter, für die Hilfe bei handwerklichen Problemen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund und Studienkollegen Albert Braun für fruchtbare technische und wissenschaftliche Diskussionen und für die Assistenz bei den operativen Eingriffen an den Versuchstieren.

Meiner Frau danke ich in Liebe für ihre Geduld und ihre großartige Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 10.07.1954	wurde ich, Karl Eckhard Baur, als Sohn des Maurermeisters Karl Josef Baur und seiner Ehefrau Else, geb. Baur, in Schwenningen am Neckar geboren.
1961 - 1965	Besuch der Grundschule in Schwenningen
1965 - 1973	Besuch des Gymnasiums am Deutenberg in Schwenningen mit abschließender Reifeprüfung
1972	Verpflichtung gemäß § 8,2 Katastrophenschutzgesetz beim Malteser-Hilfsdienst in Schwenningen
1973 - 1974	Baupraktikant im Betrieb des Vaters, Erwerb handwerklicher Grundkenntnisse
01.04.1974	Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen
April 1975	Aufnahme in die Bischöfliche Begabtenförderung "Cusanuswerk"
August 1976	Ärztliche Vorprüfung
August 1977	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1978 - 1979	Studienjahr an der Dundee University Medical School in Schottland als DAAD-Stipendiat
März 1980	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 1980 - Oktober 1981	Praktisches Jahr mit Wahlfach Anästhesie am Städtischen Krankenhaus Friedrichshafen
19.10.1981	Abschluß des Staatsexamens mit dem dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.05.1982 - 30.04.1983	Wissenschaftlicher Angestellter an der Abteilung für Herz-Thorax- und Gefäßchirurgie der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen bei Prof. Dr. med. H. E. Hoffmeister
Seit 01.05.1983	Wissenschaftlicher Angestellter an der Abteilung für Sportmedizin, Zentrum Innere Medizin der Universität Tübingen bei Prof. Dr. med. D. Jeschke
14.10.1983	Eheschließung mit Martina Tremmel, Diplompädagogin, aus Neustadt an der Weinstraße